

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-318467

(43)公開日 平成11年(1999)11月24日

(51)Int.Cl.⁵

C 1 2 N 15/00

A 6 1 K 48/00

識別記号

Z N A

A D S

F I

C 1 2 N 15/00

A 6 1 K 48/00

Z N A A

A D S

審査請求 未請求 請求項の数15 F D (全 44 頁)

(21)出願番号 特願平10-142134

(22)出願日 平成10年(1998)5月8日

特許法第30条第1項適用申請有り 1998年1月19日~1月25日 開催の「KEYSTONE SYMPOSIUM on Molecular and Cellular Biology」において文書をもって発表

(71)出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(71)出願人 598067670

国立精神・神経センター総長

東京都小平市小川東町4-1-1

(72)発明者 武田 伸一

東京都三鷹市下連雀3-42-18-501

(74)代理人 弁理士 佐伯 憲生

(54)【発明の名称】 短縮型ジストロフィン

(57)【要約】 (修正有)

【課題】 本発明は、ジストロフィン遺伝子の骨格筋に対する遺伝子導入法を確立することにある。

【解決手段】 本発明は、ジストロフィン遺伝子のヒンジ1、ヒンジ4及びロッド・ドメインのロッドリピート構造を少なくとも1個有し、4.5kb以下の長さである塩基配列、又はその塩基配列にハイブリダイズし得る塩基配列を有する筋ジストロフィー症の治療用の遺伝子、これらの遺伝子からなる筋ジストロフィーの治療剤、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター又はレンチウイルスベクターからなる筋ジストロフィーの遺伝子治療用の遺伝子導入媒体、前記の遺伝子を含有してなるアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、レンチウイルスベクター、又は、アデノウイルスベクター、並びに、当該アデノウイルスからなる筋ジストロフィーの治療剤に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ジストロフィン遺伝子のヒンジ1、ヒンジ4及びロッド・ドメインのロッドリピート構造を少なくとも1個有し、4.5kb以下の長さである塩基配列、又はその塩基配列にハイブリダイズし得る塩基配列を有する筋ジストロフィーの治療用の遺伝子。

【請求項2】 ロッド・ドメインのロッドリピート構造を2個以上有する請求項1に記載の遺伝子。

【請求項3】 さらに、システイン・リッチ・ドメインを有する請求項1又は2に記載の遺伝子。

【請求項4】 アクチン結合ドメインをさらに有する請求項1〜3のいずれかに記載の遺伝子。

【請求項5】 C末端ドメインをさらに有する請求項1〜4のいずれかに記載の遺伝子。

【請求項6】 遺伝子が配列表の配列番号1に記載された塩基配列又は当該塩基配列にハイブリダイズし得る塩基配列を有する請求項1〜5のいずれかに記載された遺伝子。

【請求項7】 遺伝子が配列表の配列番号3、5又は7に記載された塩基配列又は当該塩基配列にハイブリダイズし得る塩基配列を有する請求項1〜5のいずれかに記載された遺伝子。

【請求項8】 遺伝子が配列表の配列番号2、4、6又は8に記載されたアミノ酸配列をコードする塩基配列又は当該塩基配列にハイブリダイズし得る塩基配列を有する請求項1〜7のいずれかに記載された遺伝子。

【請求項9】 配列表の配列番号9又は11に記載された塩基配列又は当該塩基配列にハイブリダイズし得る塩基配列を有する遺伝子。

【請求項10】 請求項1〜8のいずれかに記載の遺伝子からなる筋ジストロフィーの治療剤。

【請求項11】 アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、又は、レンチウイルスベクターからなる筋ジストロフィーの遺伝子治療用の遺伝子導入媒体。

【請求項12】 請求項1〜8のいずれかに記載の遺伝子を含有してなる請求項7に記載の遺伝子導入媒体。

【請求項13】 請求項1〜8のいずれかに記載の遺伝子を含有してなるベクター。

【請求項14】 ベクターがアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、アデノウイルスベクター、又は、レンチウイルスベクターである請求項13に記載のベクター。

【請求項15】 請求項13又は14に記載のベクターを含有してなる筋ジストロフィーの治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ジストロフィン遺伝子のヒンジ1、ヒンジ4及びロッド・ドメインのロッドリピート構造を少なくとも1個有し、4.5kb以下の長さである塩基配列、又はその塩基配列にハイブリダイズし得る塩基配列を有する筋ジストロフィーの治療用

の遺伝子、これらの遺伝子からなる筋ジストロフィーの治療剤、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター又はレンチウイルスベクターからなる筋ジストロフィーの遺伝子治療用の遺伝子導入媒体、前記の遺伝子を含有してなるアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、レンチウイルスベクター又はアデノウイルスベクター、並びに、これらのベクターからなる筋ジストロフィーの治療剤に関する。

【0002】

- 10 【従来の技術】X染色体連鎖性劣性の遺伝形式をとる重症の遺伝性筋疾患であって、しかもその発症頻度が高い(出生男児3,500人に1人)デュシェンヌ型(Duchenne型)筋ジストロフィー(DMD)(エメリー著「デュシェンヌ筋ジストロフィー」第2版、オクスフォード大学[Emery, A.E.H. (1993) Duchenne Muscular Dystrophy, 2nd ed., Oxford University Press, Oxford.]参照)では、ポジショナルクローニング(positional cloning)の結果として、原因遺伝子であるジストロフィン遺伝子(14kb)が単離され(ケーニヒら、セル、50巻、509-517頁(1987年))

[Koenig, M., Hoffman, E.P., Bertelson, C.J., Monaco, A.P., Feener, C. and Kunkel, L.M., (1987) Cell, 50, 509-517]、遺伝子異常と病態の関連についても、ジストロフィン結合蛋白の関与を含めて研究が進められている。

【0003】しかし、DMD患児の骨格筋で欠損しているジストロフィンは膜に関連した細胞骨格蛋白であって(ズブルジッカー・ガーレンら、ネイチャー、333巻、466-469頁(1988年))[Zubrzycka-Gaarn, E.E., Bulman, D.E., Karpati, G., Burghes, A.H.M., Belfall, B., Klamut, H.J., Talbot, J., Hodges, R.S., Ray, P.N. and Worton, R.G. (1988) Nature 333, 466-469.]、及び、アラハタら、ネイチャー、333巻、861-863頁(1988年)[Arahata, K., Ishiura, S., Ishiguro, T., Tsukahara, T., Suhara, Y., Eguchi, C., Ishihara T., Nonaka, I., Ozawa, E. and Sugita H. (1988) Nature 333, 861-863.]、薬物治療に期待することは難しく、しかも発症者の3分の1は、母体の卵細胞レベルにおける突然変異によるため、出生前診断が必ずしも有効ではない。

【0004】従って、遺伝子治療が考慮されている。筋ジストロフィーに対する遺伝子治療を確立するためには、骨格筋に対して効率がよく安全域の広い方法が望まれる。これまで、感染力の強いアデノウイルスベクターを用いた研究が盛んに行われてきた(ラゴットら、ネイチャー、361巻、647-650頁(1993年))[Ragot, T., Vincent, N., Chafey, P., Vigne, E., Gilgenkrantz, H., Couton, D., Cartaud, J., Briand, P., Kaplan, J.-C., Perricaudet, M. and Kahn, A. (1993) Nature 361, 647-650.]、バンソンら、ネイチャー

ジェネティクス、5巻、130-134頁(1993年) [Vincent, N., Ragot, T., Gilgenkrantz, H., Couton, D., Chafey, P., Gregoire, A., Briand, P., Kaplan, J.-C., Kahn, A. and Perricaudet, M. (1993) *Nature Genet.* 5, 130-134.]、デコニックら、プロシーディング オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス USA、93巻、3570-3574頁(1996年) [Deconinck, N., Ragot, T., Marfichal, G., Perricaudet, M. and Gillis, J.M. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 3570-3574.]、及び、アクサディら、ジーン セラピー、7巻、129-140頁(1996年) [Acsadi, G., Lochmiller, H., Jani, A., Huard, I., Massie, B., Prescott, S., Simoneau, M., Petrof, B.J. and Karpati, G. (1996) *Hum. Gene Ther.* 7, 129-140.])。

【0005】しかし、第1世代のアデノウイルスベクターは、導入可能な遺伝子の長さが7.5 kbに限られ、導入遺伝子は染色体に取り込まれないが、ベクターの抗原性は高いという問題を抱えていた(アクサディら、ジーン セラピー、7巻、129-140頁(1996年) [Acsadi, G., Lochmiller, H., Jani, A., Huard, I., Massie, B., Prescott, S., Simoneau, M., Petrof, B.J. and Karpati, G. (1996) *Hum. Gene Ther.* 7, 129-140.])。

【0006】ジストロフィン分子は、構造上、N末端よりアクチン結合ドメイン、ロッド・ドメイン、システイン・リッチ・ドメイン、及び、C末端ドメインの4つの領域に分けることができる(ケーニッヒら、セル、53巻、219-228頁(1988年) [Koenig, M., Monaco, A.P. and Kunkel, L.M. (1988) *Cell* 53, 219-228.])。

【0007】このうち、ロッド・ドメインを除く3領域は、形質膜とアクチン・フィラメントを連結するのに必要なドメインである(ヘミングスら、ジャーナル セルバイオロジー、116巻、1369-1380頁(1992年) [Hemmings, L., Kuhlman, P.A. and Critchley, D.R. (1992) *J. Cell Biol.* 116, 1369-1380.]、及び、スズキら、ヨーロピアン ジャーナル オブ バイオケミストリー、220巻、283-292頁(1994年) [Suzuki, A., Yoshida M., Hayashi, K., Mizuno, Y., Hagiwara, Y. and Ozawa, E. (1994) *Eur. J. Biochem.* 220, 283-292.])。

【0008】ロッド・ドメイン(24個のリピート及びヒンジ構造からなる)は、ジストロフィン分子の76%を占め、スペクトリンとの相同性が高いことから、膜の裏打ち構造との関連が予想されてきたが、この領域の遺伝子欠失は臨床的に症状の軽いベッカー型筋ジストロフィー(BMD)を引き起こすとされている(ベグスら、ジャーナル ヒューマン ジェネティクス、49巻、54-67頁(1991年) [Beggs, A.H., Hoffman

an, E.P., Snyder, J.R., Arahata, K., Specht, L., Shapiro, F., Angelini, C., Sugita, H. and Kunkel, L. M. (1991) *Am. J. Hum. Genet.* 49, 54-67.])。実際に、ロッド・ドメインの約60%を欠失した、ごく軽症のBMD患者が報告されている(イングランドら、ネイチャー、343巻、180-182頁(1990年) [England, S.B., Nicholson, L.V.B., Johnson, M.A., Forrest, S.M., Love, D.R., Zubrzycka-Gaarn, E.E., Bulman, D.E., Harris, J.B. and Davies, K.E. (1990) *Nature* 343, 180-182.])。

【0009】このような患者の出現を契機にして、ロッド・ドメインの60%を欠失した6.3 kbのミニ・ジストロフィン遺伝子がクローニングされ、トランスジェンとしてmdxマウスに導入、あるいは第一世代のアデノウイルスベクターに組み込んでmdxマウス骨格筋に導入した場合には、筋ジストロフィーの所見を改善することが証明されている(ラグら、ネイチャー、361巻、647-650頁(1993年) [Ragot, T., Vincent, N., Chafey, P., Vigne, E., Gilgenkrantz, H., Couton, D., Cartaud, J., Briand, P., Kaplan, J.-C., Perricaudet, M. and Kahn, A. (1993) *Nature* 361, 647-650.]、バンソンら、ネイチャー ジェネット、5巻、130-134頁(1993年) [Vincent, N., Ragot, T., Gilgenkrantz, H., Couton, D., Chafey, P., Gregoire, A., Briand, P., Kaplan, J.-C., Kahn, A. and Perricaudet, M. (1993) *Nature Genet.* 5, 130-134.]、デコニックら、プロシーディング オブ ナショナル アカデミー オブサイエンス USA、93巻、3570-3574頁(1996年) [Deconinck, N., Ragot, T., Marfichal, G., Perricaudet, M. and Gillis, J.M. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 3570-3574.]、及び、アクサディら、セラピー、7巻、129-140頁(1996年) [Acsadi, G., Lochmiller, H., Jani, A., Huard, I., Massie, B., Prescott, S., Simoneau, M., Petrof, B.J. and Karpati, G. (1996) *Hum. Gene Ther.* 7, 129-140.])。

【0010】ミニ・ジストロフィン遺伝子と第一世代のアデノウイルスベクターの組み合わせが抱えていたベクターの抗原性と、組み込むことができる遺伝子の長さ制限について、二つの方向で研究が進んでいる。一つは、全てのアデノウイルス蛋白遺伝子を取り去った新しい世代のアデノウイルスベクター(gut-less adenovirus vector)の開発である。この方法は、ベクターの抗原性を軽減するだけでなく、35 kb以下の長い遺伝子の組換えを可能にした(コチャネックら、プロシーディング オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス USA、93巻、5731-5736頁(1996年) [Kochanek, S., Clemens, P.R., Mitani, K., Chen, H.-H., Chan, S. and Caskey, C.T. (1996) *Proc. Natl. Ac*

ad. Sci. USA 93, 5731-5736.])。しかし、ベクターの作製のために必要なヘルパーウイルスが最終的な産物にも混入すること、現状では、力価の測定のためのマーカーとしてlacZ遺伝子を要することなどが問題点として残されている。

【0011】もう一つの方向は、より抗原性の低い新たなウイルスベクターの開発である。最近、染色体への組み込みにより骨格筋に対して長期の安定した遺伝子導入が可能であるベクターとして、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターが開発され、しかも抗原性が低いことが明らかにされた(フィシャーら、ネイチャー・メディスン、3巻、306-312頁(1997年)[Fisher, K.J., Jooss, K., Alston, J., Yang, Y., Haecker, S. E., High, K., Pathak, R., Raper, S.E. and Wilson, J. M. (1997) Nature Med. 3, 306-312.])。しかしながら、このベクターをジストロフィン遺伝子と組み合わせる場合の問題点は、導入遺伝子がわずか4.5kbに制限されていることである(フェラリーら、ネイチャー・メディスン、3巻、1295-1297頁(1997年)[Ferrari, F.K., Xiao, X., McCarty, D. and Samulski, R.J. (1997) Nature Med. 3, 1295-1297.])。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、これらの問題を克服して、ジストロフィン遺伝子の骨格筋に対する遺伝子導入法を確立することにある。

【0013】本発明者らは、他のウイルスベクターにも応用可能な最小サイズの機能的なジストロフィン遺伝子を得るために、ミニ・ジストロフィン遺伝子のロッド部分を更に欠失した短縮型のジストロフィン遺伝子を構築した。次に、短縮型のジストロフィン遺伝子をアデノウイルスベクターに組み込んで、培養骨格筋細胞と成熟mdxマウスの骨格筋に導入し、その発現の安定性とジストロフィンと結合しているジストロフィン結合蛋白(DAP)の発現が回復するかどうかを検証した。

【0014】また、本発明者らは、lacZ遺伝子を組み換えたアデノウイルスベクターを、培養骨格筋細胞並びに成熟マウス骨格筋に対して導入し、CAGプロモーター(ニワら、ジーン、108巻、193-200頁(1991年)[Niwa, H., Yamamura, K. and Miyazaki, J. (1991) Gene 108, 193-200.])が最も高い遺伝子の発現をもたらすこと、アデノウイルスの導入に伴って、アデノウイルス蛋白及び導入遺伝子産物に対する免疫反応を生ずるが、それらはマウスのストレインにより異なることを明らかにした。これらの結果から、遺伝子治療に直接応用するには多くの問題を抱えている第1世代のアデノウイルスベクターは、培養細胞および成熟マウス骨格筋に対する遺伝子導入法としては、優れていると考え、短縮型ジストロフィン遺伝子の発現検定法として用いることにした。

【0015】

【課題を解決するための手段】本発明は、ジストロフィン遺伝子のヒンジ1、ヒンジ4及びロッド・ドメインのロッドリピート構造を少なくとも1個有し、4.5kb以下の長さである塩基配列、又はその塩基配列にハイブリダイズし得る塩基配列を有する筋ジストロフィーの治療用の遺伝子に関する。本発明の遺伝子は、ロッド・ドメインのロッドリピート構造を2個以上有していてもよい。さらに、本発明の遺伝子は、システイン・リッチ・ドメイン、アクチン結合ドメイン、及び/又は、C末端ドメインをさらに有していてもよい遺伝子に関する。また、本発明は、これらの遺伝子からなる筋ジストロフィーの治療剤に関する。

【0016】また、本発明は、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターからなる、筋ジストロフィーの遺伝子治療用の遺伝子導入媒体に関する。即ち、本発明は筋ジストロフィーの遺伝子治療用の遺伝子導入媒体として、抗原性の少ないアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いることを特徴のひとつとするものである。本発明は、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターが、前記した本発明の遺伝子のいずれかを含有してなる筋ジストロフィーの遺伝子治療用の遺伝子導入媒体に関する。

【0017】さらに、本発明は、前記した本発明の遺伝子のいずれかを含有してなるベクター、好ましくはアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、アデノウイルスベクター、又は、レンチウイルスベクターに関する。また、本発明は、前記したベクターからなる筋ジストロフィーの治療剤にも関する。

【0018】骨格筋に対する遺伝子導入について、AAVベクターは幾つかの利点を持つが、導入遺伝子の長さ制限(4.6kb)の問題を克服するためには、小型でしかも機能を持つジストロフィン遺伝子を持つ必要がある。これまで研究で用いられてきたミニジストロフィン遺伝子(6.3kb)は、大きく導入の限界を越えている。そこで、AAVベクターに組み込むことができる長さであって、治療に有効な最少限のジストロフィン遺伝子の構築を想定した。

【0019】全長型ジストロフィン遺伝子は、N末端よりアクチン結合ドメイン、ロッド・ドメイン、システイン・リッチ・ドメイン、そして、C末端ドメインをコードしている。本発明者らは、8個のロッド・リピートを持つヒトミニ・ジストロフィン遺伝子(6.3kb)を材料にして、ロッド・ドメインを更に短縮した6種類のロッド短縮型ジストロフィンcDNAを構築した(図1のA)。全ての構築物は、N末のアクチン結合ドメイン、システイン・リッチ・ドメイン、そして、C末端ドメインを残している。

【0020】デザインされたΔDysAX2, AX11, AH3及びM3は、それぞれ、3個、3個、2個、1個のロッド・リピートとヒンジ1とヒンジ4の両方を50 持っている。これらの4つの短縮型ジストロフィンにお

いて、融合部分でロッドリピートの推定トリプルヘリカル構造(ケーニッヒら、ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー、265巻、4560-4566頁(1990年)[Koenig, M. and Kunkel, L.M. (1990) J. Biol. Chem. 265, 4560-4566.])を維持するようにcDNAをデザインした(図1のB)。一方、 Δ DysH1及びH4は、ロッド・リピートは全く持たず、それぞれ、ヒンジ1か4のどちらかを持っている(図1のA、図1のC)。これらのcDNAの構築のために使用したプライマーやオリゴヌクレオチドの塩基配列は、後述する実施例1の表1に示されている。

【0021】本発明者らが構築した、ヒンジ1を含むN末端とヒンジ4を含むC末端を保持し、ロッド・リピートを一つだけ持つ短縮型ジストロフィン遺伝子 Δ DysM3は、新生仔mdxマウス骨格筋への導入実験により、筋ジストロフィーの表現型を改善する機能をもつことを確認した。 Δ DysM3よりも構造的に小さなジストロフィンについては、即ち、ロッドドメインを全て欠くが、ヒンジ1とヒンジ4を保持しているジストロフィン遺伝子については、ジストロフィンとして形質膜に局在するが、筋ジストロフィーの所見を改善し得ない。また、ヒンジ4の後半からC末端よりの小型ジストロフィンDp71は、筋ジストロフィーの所見をむしろ悪化させることも知られている。従って、これまでのところ、 Δ DysM3は、最小のジストロフィン機能単位であると考えられる。

【0022】次に、これらのジストロフィン遺伝子の構築について述べる。即ち、ヒトミニ・ジストロフィンcDNAである6.3kbの遺伝子のNotI/SalI断片を、プラスミドpBluescriptII(SK+) (ストラトジーン(Stratagene)社製)のNotI/SalI部位に挿入して、プラスミドpBSBMDを作製した。

【0023】得られたプラスミドpBSBMDとプライマーF1/R1(表1参照)またはF2/R2(表1参照)で増幅したPCR断片を、AflII/XhoIで切断した後、pBSBMDのAflII/XhoI部位に挿入し、それぞれ、pBS Δ DysAX2またはpBS Δ DysAX11を作製した。次に、鋳型のpBSBMDとプライマーF4/R4(表1参照)で増幅したPCR産物をMunI/HindIIIで切断した後、pBSBMDのMunI/HindIII部位に挿入し、pBS Δ DysM3を作製した。続いて、オリゴヌクレオチドF3/R3(表1参照)のアニーンリングにより作製した断片を、pBSBMDのAflII/HindIII部位の連結に使用し、pBS Δ DysAH3を作製した。これらの挿入断片は、連結した際、ロッド・リピートのトリプル・ヘリカル構造を維持するようにデザインした。連結したロッド・リピートのアミノ酸配列を図1のBに示す。

【0024】この結果、 Δ DysAX2, AX11, AH3及びM3は、N末端のアクチン結合ドメイン、システイン・リッチ・ドメインとC末端ドメインを保持し、更にそれぞれ3個、3個、2個、1個のロッド・リピートとヒンジ1と4の両方を持つ。 Δ DysH1と Δ DysH4のcDNAをもつ2個のプラスミドは、pBS Δ DysM3(図1のA)から作製した。1個のEcoO109I部位を除くために、pBS Δ DysM3をApaIで切断し、平滑化後、セルフライゲーションさせ、pBS Δ DysM3bを作製した。鋳型のpBS Δ DysM3とプライマーF5/R5(表1参照)を使って増幅したPCR産物をEcoT22I/EcoO109Iで切断した後、これをpBS Δ DysM3bのEcoT22I/EcoO109I部位に挿入し、pBS Δ DysH1を作製した。

【0025】pBS Δ DysH4の作製のために、pBS Δ DysM3を鋳型とし、プライマーF5/R6(表1参照)あるいはF6/R7(表1参照)を使って2種類のPCR反応を別個に行った。得られた2種類のPCR産物の混合物を鋳型として、プライマーF5/R7(表1参照)を使って2回目のPCR反応を行った。得られた断片をEcoRVで切断した後、これをpBS Δ DysM3中の2個のEcoRV部位の間に挿入した。連結領域のアミノ酸配列を図1のCに示す。得られた Δ DysH1及びH4は、ロッド・リピートは全く持たず、それぞれ、ヒンジ1か4のどちらかを持つ(図1のA)。

【0026】図1は、様々な数のロッド・リピートを持つ短縮型ジストロフィン遺伝子の構築を示したものである。図1のAは、ヒト全長型ジストロフィン遺伝子、ミニジストロフィン遺伝子及び新しく作製した短縮型ジストロフィンcDNAの一覧図である。 Δ DysAX2, Δ DysAX, Δ DysAH3及び Δ DysM3を構築するために、ミニジストロフィンcDNAの中央部のロッド・ドメインをそれぞれの構築物の右側に示した制限酵素で切断した。ロッド・リピート構造を再構築するために、PCR増幅断片あるいは合成DNA断片を使って得られた両末端を連結させた。 Δ DysH1及び Δ DysH4を構築するために、 Δ DysM3を図示した制限酵素で切断後、PCR増幅断片を使って両末端を連結した。点線は連結部を示す。cDNAのサイズと短縮型ジストロフィンの推定分子量を右側に示す。アクチン結合ドメインを点々のボックスで、ロッド・ドメインを白抜きのボックスで(それぞれのリピートを1個のボックスで示す)、システイン・リッチ・ドメインを斜線の入ったボックスで、そして、C末端ドメインは陰を付けたボックスで図示する。黒色のボックスはヒンジを示す。ヒンジの記載はM. KoenigとL. M. Kunkelの記述に従った。

50 【0027】図1のBは、 Δ DysAX2(AX2),

ΔDysAX11 (AX11), ΔDysAH3 (AH3) 及び ΔDysM3 (M3) における再構築したロッド・リピートのアミノ酸配列を示す。縦線は連結部位を示す。三角形と点線は、ロッド・リピートの整列を最適化するためのギャップと欠失の位置を示す (M. Koenig と L. M. Kunkel による)。CS1 と CS2 はジストロフィンの24個のリピートのコンセンサス配列を示す。CS1 は、24個のリピートのうち少なくとも8個のリピートの中に見つかったアミノ酸を、CS2 は5、6あるいは7個のリピートに見られるアミノ酸を示す。

【0028】図1のCは、ΔDysH1 (H1) 及び ΔDysH4 (H4) における連結領域のアミノ酸配列 ΔDysH1 (H1) では、ヒンジ1はシステイン・リッチ・ドメインに直結する。ΔDysH4 (H4) では、アクチン結合ドメインはヒンジ4に直結する。ヒンジ1にあるチロシン (T) (星印) は、北アメリカのXLCMの家系でアラニン (A) に変異していた。ヒンジ4の下点線はWWドメインを示す; WWドメインのうち、最も保存されたアミノ酸を下線で示す。

【0029】次に、前記の方法で得られたそれぞれの短縮型ジストロフィンcDNAをアデノウイルスベクターに導入する方法について述べる。COS-TPC法 (ミヤケら、*プロシーディング オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス USA*, 93巻、1320-1324頁 (1996年) [Miyake, S., Makimura, M., Kanegae, Y., Harada, S., Sato, Y., Takamori, K., Tokuda, C. and Saito, I. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 1320-1324.]) により、各短縮型ジストロフィンを発現するE1置換型組み換えアデノウイルスベクターを作製することができる。

【0030】前記の方法で得られたそれぞれの短縮型ジストロフィンcDNA、ΔDysAX2、AX11、AH3、M3、H1及びH4を、カセットコスミドpAXCAwt (カネガエら、*ヌクレイック アシッド レサーチ*, 23巻、3816-3821頁 (1995年) [Kanegae, Y., Lee, G., Sato, Y., Tanaka, M., Nakai, M., Sakaki, T., Sugano, S. and Saito, I. (1995) *Nucl. Acids Res.* 23, 3816-3821.]) のCAG発現ユニット (ニワら、*ジーン*, 108巻、193-200頁 (1991年) [Niwa, H., Yamamura, K. and Miyazaki, J. (1991) *Gene* 108, 193-200.]) の中へ挿入した。この発現ユニットは、試験管内 (in vitro) (前掲、ニワらの文献) 及び生体内 (in vivo) (アラキら、*プロシーディング オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス USA*, 92巻、160-164頁 (1995年) [Araki, K., Araki, M., Miyazaki, J. and Vassalli, P. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 160-164.]) において、強い発現を示すことが知られている。

【0031】各組み換えアデノウイルスの作製は、293細胞内において、得られたコスミドとAd5 d1x (サイトウら、*ジャーナル オブ ヴァイロロジー*, 54巻、711-719頁 (1985年) [Saito, I., Oya, Y., Yamamoto, K., Yuasa, T. and Shimojo, H. (1985) *J. Virol.* 54, 711-719.]) のDNA-末端蛋白質複合体との間の相同性組み換えにより行われた。得られた組み換えアデノウイルスベクターを、AxCADysと命名し、既に述べられた方法 (カネガエら、*ジャパニーズ ジャーナル オブ メディカル サイエンス バイオロジー*, 47巻、157-166頁 (1994年) [Kanegae, Y., Makimura, M. and Saito, I. (1994) *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 47, 157-166.]) で、増殖、精製及び力価測定を行った。各AxCADysを10%グリセロールを含むリン酸緩衝化生食水 (PBS) 中、-80℃で保存した。

【0032】本発明の組換えアデノウイルスベクターを用いた培養骨格筋細胞における短縮型ジストロフィンの発現を次のようにして確認した。即ち、短縮型ジストロフィンが正しく転写・翻訳されることを調べるために、マウス骨格筋細胞株C2C12細胞に各AxCADysを感染させウエスタン・ブロット解析を行った。C2C12細胞に各組み換えアデノウイルスを100moiの割合で感染させ、その後、培養液の交換により分化を誘導した。感染3日後に、細胞を回収した。全細胞抽出物 (20μg/lane) をSDS-PAGE (5%アクリルアミド) で分離し、PVDF膜に転写後、モノクローナル抗体DYS2と反応させた。この抗体はジストロフィンの最後の17アミノ酸に反応する。その結果を図2に示す。図2のレーン1は非感染C2C12細胞からのものであり、レーン2はAxCADysAX2を用いたものであり、レーン3はAxCADysAX11を用いたものであり、レーン4はAxCADysAH3を用いたものであり、レーン5はAxCADysM3を用いたものであり、レーン6はAxCADysH1を用いたものであり、レーン7はAxCADysH4を用いたものである。図2中のMWは、分子量 (kDa) を示す。

【0033】それぞれの短縮型ジストロフィン遺伝子は、予測された大きさを示した (図2、レーン2~6) が、ΔDysH4は予測 (103kDa) よりも大きい位置に出現した (図2、レーン7)。AxCADysH4 (図2、レーン7) の産物は予測されたよりも移動度が遅かった。内因性のジストロフィンは培養骨格筋細胞では検出されなかった。なぜなら、細胞は十分に成熟した筋管細胞に分化していなかったからである。短縮型ジストロフィンの量を比較した場合、ΔDysM3は最も高い発現レベルを示した。これらの結果は、組み換えAxCADysが効果的に培養骨格筋細胞に感染し、CAGプロモーターの制御下で短縮型ジストロフィ

11

ンを発現すること、さらに、 Δ DysM3蛋白質が最も安定して発現することを示した。

【0034】さらに、組換えアデノウイルスベクターを用いた本発明の短縮型ジストロフィンが、生体内 (in vivo) において、筋線維で安定に発現するかどうかを調べるために、組み換えたAxCADysを、成熟mdxマウスの前脛骨筋(TA)に直接導入し、免疫組織学的解析を行った(図3(図面に代わる写真))。組み換えアデノウイルスを、成熟mdxマウスの前脛骨筋に直接導入した。導入したベクター量は、後述する実施例4

の表2に記載した量である。注射の7日後、マウスからTAを取り出し、凍結切片とウサギポリクローナル抗体anti-Cを使ってジストロフィンの抗体染色を行った。この抗体は、ジストロフィンのC末端を認識する。【0035】図3のB10は正常成熟C57BL/10マウスであり、図3のmdxは非導入mdxマウスであり、図3のAX2はAxCADysAX2であり、図3のAX11はAxCADysAX11であり、図3のAH3はAxCADysAH3であり、図3のM3はAxCADysM3であり、図3のH1はAxCADysH1であり、図3のH4はAxCADysH4をそれぞれ用いた場合を示している。写真中のバーは、スケールを示しており、バーの長さが100 μ mであることを示している。

【0036】既に報告されているように、HE染色では組み換えアデノウイルスによる単核細胞の強い浸潤や筋線維の壊死が検出された。ジストロフィン陽性線維は、ダメージを受けた領域の周辺に群れをなして出現する傾向があった。 Δ DysH1を除く全ての短縮型ジストロフィンは、一枚の同じスライド上で検討したときにも、正常対照におけるC57BL/10マウスのジストロフィンよりも強く形質膜に発現していた。ジストロフィン陽性線維の割合は、mdx骨格筋に見られるリバータント線維よりも明らかに多かった。さらに、ジストロフィンの19番目のロッド・リピートに対するP23a抗体(ヨシダら、ジャーナル オブ バイオケミストリー、108巻、748-752頁(1990年)[Yoshida, M. and Ozawa, E. (1990) J. Biochem. 108, 748-752.])を用いて、ジストロフィン陽性線維がリバータント線維でないことを確認した。

【0037】AxCADysを導入した骨格筋において、ジストロフィンの免疫染色の強度は、線維間で大きく変化していたけれども、AxCADysM3を導入した骨格筋において、強い免疫蛍光が一貫して観察された(図3)。対照的に、AxCADysH1を導入した骨格筋においては、形質膜でのジストロフィン陽性線維のシグナルは、微弱および不連続であった。

【0038】mdxマウスの骨格筋における各短縮型ジストロフィンの効果を評価するために、本発明者らは、それぞれのAxCADysを導入した骨格筋からクラ

12

スターを形成した3ヶ所の領域をピックアップし、短縮型ジストロフィンを発現している線維の数及びジストロフィンの免疫蛍光の強度を、別々に評価した。その結果を、表2に要約した。これらの結果は、短いロッド・ドメインとヒンジ1と4の両方を持つ短縮型ジストロフィンが、効果的に形質膜に局在できることを示唆している。 Δ DysH1に見られるように、ヒンジ4の欠失は、形質膜への局在を大きく減少させる結果となった。

【0039】次に、形質膜におけるジストロフィン結合蛋白質(DAP)の発現回復について検討した。ジストロフィン-DAP複合体を形成するための鍵分子としてのジストロフィンの機能を評価するために、本発明者らは、AxCADysを導入後のmdx骨格筋の形質膜におけるDAPsの発現を調べた。AxCADysM3を注射したmdx骨格筋の形質膜におけるジストロフィン結合蛋白質の回復をみるために、図3で説明した方法で遺伝子の導入と抗体染色を行った。図4(図面に代わる写真)にその結果を示す。AxCADysM3を導入したmdxマウスにおいて、ジストロフィンを発現している筋線維は β -ジストログリカン、 α -サルコグリカン及び α 1-シントロフィンに対する抗体で強く染色された。ジストロフィン陰性線維(図4中の星印)では、DAPは陰性であった。AxCADysH1を注射したmdx骨格筋では、形質膜でのジストロフィン陽性線維のシグナルは極端に弱かった。そのような線維では、DAPは形質膜に検出されなかった。写真中のバーは、スケールを示しており、バーの長さが50 μ mであることを示している。

【0040】mdx骨格筋では、DAPsの発現が減少している(オーエンディックら、ジャーナル オブ セル バイオロジー、115巻、1685-1694頁(1991年)[Ohlndieck, K. and Campbell, K.P. (1991) J. Cell Biol. 115, 1685-1694.]) (図4)のに対して、AxCADysH1以外のAxCADysを導入した骨格筋では、ジストロフィン陽性線維においてDAPsの形質膜での発現が、著しく回復した。興味深いことに、ジストロフィンの発現レベルに関わらず、DAPsの免疫蛍光の強度が類似していた。しかしながら、AxCADysH1を導入したmdx骨格筋では、形質膜に沿ったDAPsの免疫蛍光は検出困難であった。特に、AxCADysH1を導入したmdx骨格筋のジストロフィン陽性線維では、 β -ジストログリカンと α -サルコグリカンのシグナルが極端に低かった。これらの結果から、 Δ DysH1以外の形質膜で発現した短縮型ジストロフィンは効果的に形質膜のDAPsの発現を回復させることが分かった。

【0041】これらの組換えアデノウイルスベクターの成熟マウス骨格筋への導入では、ウイルスベクターの抗原性により、遺伝子導入産物の長期間の発現を期待することができない。しかし、新生仔マウスへの遺伝子導入

では、免疫寛容が成立するので、短縮型ジストロフィン遺伝子を組み込んだ組換えアデノウイルスベクターのうちAxCAΔDysM3について、新生仔mdxマウス骨格筋への導入を行い、長期間発現させることにより、筋ジストロフィーの表現型を改善することができるかどうか検証した。

【0042】生後1週のmdxマウス一側後肢の腓腹筋中央部にAxCAΔDysM3とAxCALacZの混合物6μlを直接導入した。4週間後、後肢の腓腹筋部の骨格筋を取り出し、H&E染色、X-Gal染色及びジストロフィン染色を行った。この結果、アデノウイルスを注入した側の後肢の腓腹筋群について、アデノウイルスベクターの導入を確認するために、X-Gal染色を行うと、腓腹筋群のうち浅指屈筋(flexor digitorum superficialis)において、最も高率に、遺伝子を導入されている線維が認められた。このβ-Gal陽性領域についてジストロフィンの免疫染色を行ったところ、ほとんどの線維においてジストロフィンが発現していた。同部分について、H&E染色を行って詳しく観察したところ、非導入側の浅指屈筋(flexor digitorum superficialis)と比較して、筋の変性・壊死像及び中心核線維数が著しく減少していた。

【0043】本発明者らは、短縮型ジストロフィン遺伝子を組み込んだ組換えアデノウイルスベクターを培養骨格筋細胞株C2C12及び成熟mdxマウスの骨格筋に感染させることにより、本発明でデザインした短縮型ジストロフィンが、筋細胞のなかで安定して発現するかどうか検討してきた結果、広い感染域を持つアデノウイルスベクターと骨格筋において強力なCAGプロモーターを組み合わせることで、成熟mdxマウスの骨格筋に導入した際の短縮型ジストロフィンの発現を比較することができた。

【0044】ロッド・リピートを1個のみを持つΔDysM3は、試験管内(in vitro)において最も高い発現を示した。クレメンス等はロッド・ドメインのイン・フレーム欠失を持つ3種の短縮型ジストロフィン(3.0、4.4及び5.7kb欠失)を作製した(クレメンスら、ヒューマン ジーン セラピー、6巻、1477-1485頁(1995年)[Clemens, P.R., Krause, T.L., Chan, S., Korb, K.E., Graham, F.L. and Caskey, C.T. (1995) Hum. Gene Ther. 6, 1477-1485.])。これらは、15、10または6個のロッド・リピートを持つ。彼らは、培養骨格筋細胞に対する導入実験において、これらのジストロフィンの産生量は、その欠失の大きさのみにより決定されるものではないことを示した。本発明者らも、また、ロッド・ドメイン中に欠失を持つ短縮型ジストロフィンの安定性は、ロッドの数に依存していないと結論した。これらの結果は、欠失の大きさはジストロフィンの産生量や症状の重さのどちらとも関係していないというBMD患者にみられる所見と一致し

た。

【0045】AxCAΔDysを成熟mdxマウスの骨格筋に導入したときもまた、ΔDysM3は、より多くのロッド・リピートを持つ短縮型ジストロフィンと同様に効果的に発現した。ジストロフィンが発現している筋線維の頻度は、投与したウイルス量に比例する傾向があった。また、正確なΔDysM3の高次構造が決定されたわけではないが、成熟マウスの骨格筋においても安定であることが関与しているように思われる。

10 【0046】AxCAΔDysH1とAxCAΔDysH4についても、他のAxCAΔDysと同じように多量のウイルスを成熟mdxマウスの骨格筋に導入したが、それらの発現は他のΔDysに比べて明らかに低かった。これは、ΔDysH1とΔDysH4が共にロッド・リピートを完全に欠失していることが原因であろう。特に、ヒンジ4を欠失したΔDysH1の発現は極端に低かった。ヒンジ4には「WWドメイン」(シュドールら、ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー、270巻、14733-14741頁(1995年)[Sudol, M., Bork, P., Einbond, A., Kastury, K., Druck, T., Negrini, M., Huebner, K. and Lehman, D. (1995) J. Biol. Chem. 270, 14733-14741.])が含まれており、このドメインがβ-ジストログリカンのXP PXYモチーフに結合することによって、ジストロフィン分子が形質膜に繋ぎ止められていると提唱されている(アインボンドら、フェブス レターズ、384巻、1-8頁(1996年)[Einbond, A. and Sudol, M. (1996) FEBS Letters 384, 1-8.])。それで、本発明者らは、β-ジストログリカンへの結合が低下したため

30 に、ΔDysH1は不安定化したと推測した。
【0047】ΔDysH4はヒンジ1を欠失している。ヒンジ1領域の重要性が最近指摘された。北アメリカのX染色体連鎖性拡張型心筋症の家系において、ヒンジ1領域中にミスセンス変異が同定され、ジストロフィン分子の構造が変化していることが想定された(オルティエーロベツら、サーキュレーション、95巻、2434-2440頁(1997年)[Ortiz-Lopez, R., Li, H., Su, J., Goytia, V. and Towbin, J.A. (1997) Circulation 95, 2434-2440.])。このような理由からΔDysH4の発現の減少には、ヒンジ1の欠損が関与しているのかもしれないと考えた。

40 【0048】ミニ・ジストロフィンcDNAのトランスジェニックの研究(ウエルズら、ヒューマン モレキュラー ジェネティクス、4巻、1245-1250頁(1995年)[Wells, D.J., Wells, K.E., ASante, E.A., Turner, G., Sunada, Y., Campbell, K.P., Walsh, F.S. and Dickson, G. (1995) Hum. Mol. Genet. 4, 1245-1250.])から予測されたように、ΔDysM3のような小さな短縮型ジストロフィンでも、C端側のドメインが保持されていれば、mdxマウス骨格筋において

15

DAPsを集積させることができた。すなわち、本発明の実験により、ヒンジ4とシステイン・リッチ・ドメインの両方を持つ短縮型ジストロフィンが、効果的にDAPsを形質膜に集積させることが証明された。しかし、注目すべきことは、DAPsの回復が必ずしも筋ジストロフィーの発症の防止または軽減を意味する訳ではないということである。

【0049】形質膜においてDAPsが回復しても、ジストロフィン機能の改善には不十分である場合がある。ジストロフィンの分子種の1つで、ロッド・ドメイン及びN末端のアクチン結合ドメインを欠いているDp71遺伝子をmdxマウスに対して、トランスジーンとして導入した実験では、DAPsが完全な回復を示したにも関わらず、筋ジストロフィーの表現型には、効果的な改善はなかった(コックスら、ネイチャー ジェネティクス、8巻、333-339頁(1994年)[Cox, G.A., Sunada, Y., Campbell, K.P. and Chamberlain, J.S. (1994) Nature Genet. 8, 333-339.]、及び、グリーンベルグら、ネイチャー ジェネティクス、8巻、340-344頁(1994年)[Greenberg, D. S., Sunada, Y., Campbell, K.P., Yaffe, D. and Nudel, U. (1994) Nature Genet. 8, 340-344.])。

【0050】一方、チャンバーレイン(Chamberlain)らは、一連の短縮型ジストロフィン遺伝子を構築し、mdxマウスに対してトランスジーンとして導入して検討したところ、ヒンジ1までのN端側とヒンジ4以下のC端側を持つが、ロッド部分を全て欠損したタイプのジストロフィンは、膜に安定して発現するが、筋ジストロフィーの表現型には改善が見られないことを明らかにしている。この観点から、短縮型ジストロフィンΔDysM3の生体内(in vivo)での機能を証明するためには、長期的な発現が可能な実験が必要である。

【0051】実際、本発明者らは、新生児のmdxマウス骨格筋にΔDysM3をコードしたアデノウイルスベクターを導入して4週後に、その効果を検討したところ、アデノウイルスベクターが導入された部分では、筋変性の減少と筋変性の結果として生ずる筋再生の指標である中心核線維がほぼ消失するという結果を得ている。この短縮型ジストロフィンが、筋ジストロフィーの表現型を改善するかどうかを決定するために、より長期間の発現系が必要であろうと思われるので、この点についてはさらにトランスジェニックマウスを用いた実験が必要となるかもしれない。

【0052】本発明において、ロッド・リピートを1個でも保持する短縮型ジストロフィンが、成熟したmdxマウスの骨格筋で効果的に発現することを示した。既に明らかなように、第1世代のアデノウイルスベクターは、宿主において強い免疫反応を引き起こす。

【0053】そこで、筋ジストロフィーに対する遺伝子治療においては、将来的に、宿主において免疫反応を誘

16

導せず、そして、導入遺伝子の長期発現を与えるような新しいベクターの使用が検討されている。特に、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターは、導入遺伝子が染色体に取り込まれることにより、骨格筋において安定した発現が期待できるという利点を持っている。

【0054】ところが、このベクターに挿入できる遺伝子はわずか、4-4.5kbに限られていた。従って、ジストロフィン遺伝子については、14kbの全長の遺伝子は勿論、6.3kbのミニ・ジストロフィン遺伝子にしても、挿入することは不可能である。本発明で得られた短縮型ジストロフィン遺伝子、特にロッド・リピートを1個のみ保持する3.7kbのΔDysM3cDNAは、アデノ随伴ウイルスベクターに挿入する極めて良好な遺伝子である。

【0055】以上の結果から明らかなように、本発明の筋ジストロフィーの治療用の遺伝子は、ジストロフィン遺伝子のヒンジ1、ヒンジ4及びロッド・ドメインのロッドリピート構造を少なくとも1個有し、4.5kb以下の長さである塩基配列、又はその塩基配列にハイブリダイズし得る塩基配列を有することを特徴とするものである。本発明の遺伝子は、ロッド・ドメインのロッドリピート構造を1個有していればよいのであるが、場合によっては2個以上、好ましくは2個又は3個有していてもよい。これらのロッドリピート構造は、全く同じ塩基配列を有するものが好ましいが、その一部が他の塩基で置換されていても、さらに他の塩基配列が付加されていても、また、一部の塩基が欠失していてもよい。

【0056】本発明の遺伝子は、さらに、システイン・リッチ・ドメイン、アクチン結合ドメイン、及び、C末端ドメインを有しているものが好ましい。本発明のcDNAは、全長が4.5kb以下であればよく、好ましくは4.2kb以下、より好ましくは4.0kb以下、さらに好ましくは3.7kb以下であってもよい。

【0057】本発明の遺伝子は、これを筋ジストロフィーの治療剤として用いることができる。本発明の遺伝子を患者に導入する方法としては、従来から使用されてきた方法を使用することもできるが、本発明の遺伝子をアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターに組み込んで使用するのが好ましい。導入方法は公知の方法を採用することができる。

【0058】また、本発明は、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターからなる筋ジストロフィーの遺伝子治療用の遺伝子導入媒体を提供するものである。アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターは、他の疾患の遺伝子治療用の遺伝子導入媒体として使用されていたが、本発明により初めて筋ジストロフィーの遺伝子治療用の遺伝子導入媒体として使用できる可能性が判明し、当該ベクターの新たな用途を見出したものである。筋ジストロフィーの遺伝子治療用の遺伝子導入媒体は、前記した本発明の遺伝子のいずれかを含有してなるものが好ましいが、本

発明の筋ジストロフィーの遺伝子治療用の遺伝子導入媒体は、これらに限定されるものではない。

【0059】本発明のアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターは、前記した本発明の遺伝子のいずれかを含有するものである。アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターに本発明の遺伝子を導入する方法には、特に制限はなく、当業者が通常行う方法により導入することができる。また、本発明のアデノウイルスベクターは、前記した本発明の遺伝子のいずれかを通常の方法によりアデノウイルスベクターに導入することにより製造することができる。

【0060】本発明のアデノウイルスからなる筋ジストロフィーの治療剤は、ウイルスを用いた従来の遺伝子治療法と同様な方法で使用する事ができる。

【0061】

【実施例】以下に実施例を挙げて、本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0062】実施例1(ロッド短縮型ジストロフィン遺*

プライマー	プライマーの配列(5'-3')	配列の位置
F1	<u>GCCGGCGAACAACCTTAAGGTATTG</u>	1799-1816
2	<u>GCCGGCCTTAAGGAGGTCAATACTGAG</u>	8936-8950
3	<u>TTAAGGTATTGAACACCCAGATGGA</u>	1806-1816, 9269-9281
4	<u>GCCGGCCAATTGGGAAGTAAGCTG</u>	1409-1426
5	<u>GGAACATGCATTCAACATCGCC</u>	796-817
6	<u>CAGGAAGTGGGAAGCCACAGGGACTTTGGTCCAG</u>	953-964, 9329-9350
R1	<u>GCCGGCCTCGAGACTTGATAACATTTC</u>	2005-1991
2	<u>GGCGCCTTGACTTTCTCGAGGTGATC</u>	9144-9125
3	<u>AGCTTCCATCTGGTGTTCATATCC</u>	9285-9269, 1816-1810
4	<u>GCCGGCAAGCTTCCATCTTGAATTTAG</u>	1501-1486
5	<u>CGGCAGGGCCTTCTGCAGTCTTCGGTCTTCAGGAGCTTCC</u>	9564-9545, 1189-1174
6	<u>GTCCCTGTGGGCTTCCACTTCCTGGATGGC TTC</u>	9340-9329, 964-944
7	<u>ATCTGCAGGATATCCATGG</u>	9657-9639

【0064】表1中の、短縮型ジストロフィンの構築のために使用した合成オリゴヌクレオチドのDNA配列オリゴヌクレオチドF3とR3は、DNA断片形成のために直接アニーリングするのに使用した。他のオリゴヌクレオチドは、PCR反応のためのプライマーとして使用した。下線は、ヒトジストロフィンcDNAの塩基配列(GeneBank accession number M18533)に相当する。鋳型のpBSBMDと、プライマーF1/R2またはF2/R2で増幅したPCR断片をAflIII/XhoIで切断した後、pBSBMDのAflIII/XhoI部位に挿入し、それぞれ、pBSΔDysAX2またはpBSΔDysAX11を作製した。鋳型のpBSBMDとプライマーF4/R4で増幅したPCR産物をMunI/HindIIIで切断した後、pBSBMDのMunI/HindIII部※50

*伝子の構築)

以下に示す方法を用いて、ロッド・ドメインをさらに短縮したジストロフィン遺伝子を6種類構築した(図1のA参照)。最初に、ヒトミニ・ジストロフィンcDNA(アスカディら、ネイチャー、352巻、615-818頁(1991年)[Acadi, G., Dickson, G., Love, D.R., Jani, A., Walsh, F.S., Gurusinge, A., Wolf, T.A., and Davies, K.E. (1991) Nature 352, 815-818.])である6.3kbのNotI/SalI断片をpBluescriptII(SK+) (Stratagene)のNotI/SalI部位に挿入してpBSBMDを作製した。次に、AX2, AX11, AH3, M3と名付けた短縮型ジストロフィン(ΔDys)のcDNAを持つ4つのプラスミドを以下に示すように作製した。cDNAの構築のために使用されたプライマーやオリゴヌクレオチドの塩基配列を、表1に示す。

【0063】

【表1】

※位に挿入し、pBSΔDysM3を作製した。オリゴヌクレオチドF3/R3のアニーリングにより作製した断片を、pBSBMDのAflIII/HindIII部位の連結に使用し、pBSΔDysAH3を作製した。

【0065】一方、ΔDysH1とΔDysH4のcDNAをもつ2個のプラスミドは、pBSΔDysM3(図1のA参照)から作製した。まず、EcoO109I部位を一つ除くために、pBSΔDysM3をApaIで切断、平滑化後、セルフライゲーションさせpBSΔDysM3bとした。鋳型のpBSΔDysM3と、プライマーF5/R5を使って増幅したPCR産物を、EcoT22I/EcoO109Iで切断した後、pBSΔDysM3bのEcoT22I/EcoO109I部位に挿入し、pBSΔDysH1を作製した。pBSΔDysH4の作製のためには、2種類のPCR反応

を、pBSΔDysM3を鋳型として、プライマーF5/R6あるいはF6/R7を使って別個に行った。得られた2種類のPCR産物の混合物を鋳型として、プライマーF5/R7を使って2回目のPCR反応を行った。得られた断片をEcoRVで切断した後、これをpBSΔDysM3中の2個のEcoRV部位の間に挿入した。連結領域のアミノ酸配列を図1のBと図1のCに示す。

【0066】得られた4種のM3、AX11、AX2、及び、AH3のcDNAの塩基配列を配列表の配列番号1、3、5、及び7にそれぞれ示す。また、2種のH1及びH4のcDNAの塩基配列を配列表の配列番号9及び11にそれぞれ示す。これらのcDNAによりコードされるアミノ酸配列を配列表の配列番号2、4、6、8、10、及び、12にそれぞれ示す。

【0067】実施例2（短縮型ジストロフィンを発現する組み換えアデノウイルスベクターの作製）
COS-TPC法により、各短縮型ジストロフィンを発現するE1置換型組み換えアデノウイルスベクターを作製した。それぞれの短縮型ジストロフィンcDNA、ΔDysAX2、AX11、AH3、M3、H1及びH4を、カセットコスミドpAXCAwtのCAG発現ユニットの中へ挿入した。この発現ユニットは、試験管内（in vitro）及び生体内（in vivo）において、強い発現を示す。各組み換えアデノウイルスベクターの作製は、293細胞内において、得られたコスミドとAd5dlxのDNA-末端蛋白質複合体との間の相同性組み換えにより行われた。得られた組み換えアデノウイルスベクターを、AxCAΔDysと命名し、既に述べられた方法で、増殖、精製及び力価測定を行った。各AxCAΔDysを10%グリセロールを含むリン酸緩衝化生食水（PBS）中、-80℃で保存した。

【0068】実施例3（アデノウイルスベクターを用いた培養骨格筋細胞への遺伝子導入）
C2C12筋芽細胞のサブクローンの一つ（ヨシダら、ジャーナル オブ セル バイオロジー、132巻、818-193頁（1996年）[Yoshida, S., Fujisawa-Sehara, A., Taki, T., Arai, K. and Nabeshima, Y. (1996) J. Cell Biol. 132, 181-193.]）（約1.0×10⁵個）を、6cmコラーゲンコートディッシュに撒き、20%（vol/vol）仔牛血清を含むDMEM

中で1日間培養した。筋芽細胞にAxCAΔDysを100プラークフォーミング ユニット/セル（plaque-forming unit (pfu)/cell (moi)）の割合で感染させ、増殖培地をDMEMと5%（vol/vol）ウマ血清を含む分化培地に置き換えた。3日後、細胞を回収し、SDS-PAGE溶解バッファー（15% SDS、70mM Tris-HCl pH6.8、5%β-メルカプトエタノール（β-mercaptoethanol）、10mM EDTA）に懸濁した。

【0069】1レーン当り、20μgの細胞溶解液を5% SDS-PAGEで分離し、PVDF膜（Immobilion (TM)、Millipore）にエレクトロブロッピングさせた。プロットを100倍希釈したジストロフィンモノクローナル抗体DYS2（Novocastra）とインキュベーションした。この抗体は、ヒト・ジストロフィンの最後の17アミノ酸を認識する。プロット上の免疫複合体を、パーオキシダーゼ標識したウサギ抗マウスIgG1（Zymed）とECLウエスタン・プロテイング検出試薬（Amersham）を用いて検出した。

【0070】結果を図2に示す。ΔDysH4を除く、それぞれの短縮型ジストロフィンは予測された大きさを示した。短縮型ジストロフィンの発現量の比較では、ΔDysM3が最も高い発現レベルを示した。これらの結果は、組み換えたAxCAΔDysが効果的に培養骨格筋細胞に感染し、CAGプロモーターの制御下で短縮型ジストロフィンを発現することを示している。

【0071】実施例4（アデノウイルスベクターを用いたmdxのマウス骨格筋への生体内（in vivo）遺伝子導入）
生体内（in vivo）遺伝子導入の前に、グリセロールを除去するために、各AxCAΔDysのストックをPBSで飽和させたCHROMA SPINTMカラム（Clontech）に通した。精製したAxCAΔDys液50μlを、12-16週齢のmdxマウスの左足の前脚筋に27ゲージの注射針を用いて直接注射（筋注）した。導入した各々のベクターの量とその結果を次の表2に示す。

【0072】

【表2】

組換 アデノウイルス	ウイルスの投与量 ($\times 10^8$ pfu/筋)	ジストロフィン 陽性繊維 平均 (範囲)	形質膜における 免疫蛍光の強度	n
AxΔDysAX2	8.6	32% (22-39)	++	4
AxΔDysAX11	2.2	27% (11-56)	++	4
AxΔDysAH3	14	33% (15-45)	++	4
AxΔDysM3	16	33% (22-51)	+++	8
AxΔDysH1	6.0	12% (3-22)	+	3
AxΔDysH4	13	21% (16-31)	++	3

【0073】表2は、ベクターの使用量とアデノウイルスベクターを用いて短縮型ジストロフィンcDNAをmdx骨格筋へを導入した際の定量分析の結果を示している。表2中の「*」印は、選択領域のジストロフィン陽性繊維の百分率を示し、「**」印はジストロフィンの形質膜でのシグナル強度を0から+++に評価した結果を示している。1週間後、骨格筋を取り出し、液体窒素で冷却したイソペンタン中で凍結させた。遺伝子導入を行った、及び、遺伝子導入していないmdx骨格筋と正常対照のC57BL/10骨格筋から、6μmの切片を同じ1枚のスライド上に準備して風乾した後、アセトンで10分間固定した。

【0074】次に挙げる抗体を用いて免疫組織染色を行った。ジストロフィンの最C末端25アミノ酸を認識するウサギポリクローナル抗体 (anti-C、野々村 (Y. Nonomura) 博士より入手した。)、19番目のロッドリピートに相当するジストロフィンのアミノ酸2360から2409を認識するウサギポリクローナル抗体 (P23a、吉田 (M. Yoshida) 博士より入手した。)(ヨシダら、ジャーナル オブ バイオケミストリー、108巻、748-752頁 (1990年) [Yoshida, M. and Ozawa, E. (1990) J. Biochem. 108, 748-752.])、β-ジストログリカンに対するヤギポリクローナル抗体、α-サルコグリカンに対するウサギポリクローナル抗体 (若山 (Y. Wakayama) 博士より入手した。)(ワカヤマら、アナリス オブ ニューロロジー、39巻、217-223頁 (1996年) [Wakayama, Y., Inoue, M., Murahashi, M., Shibuya, S., Jimi, T., Kojima, H. and Oniki, H. (1996) Ann. Neurol. 39, 217-223.])、α1-シントロフィンのアミノ酸191から206 (ピーターら、ニューロレポート、5巻、1577-1580頁 (1994年) [Peters, M.F., Kramarcy, N.R., Sealock, R. and Froehner, S.C. (1994) NeuroReport 5, 1577-1580.])に対するウサギポリクローナル抗体 (亀谷 (S. Kameya) 博士より入手した。)

【0075】一次抗体を、FITC標識したヤギ抗ウサギIgG (Tago Immunological s)、或いは、ウサギ抗ヤギIgG (Organon

*Teknika)を用いて検出した。結果は、レーザースキャンニングコンフォーカルイメージングシステムMRC-1000 (Bio-Rad) を使って記録した。【0076】結果を図3に示す。その結果、短いロッド・ドメインとヒンジ1と4の両方を持つ短縮型ジストロフィン (ΔDysAX2, AX11, AH3及びM3) が、効果的に形質膜に局在できることを示唆している。ΔDysH1に見られるヒンジ4の欠失は、形質膜への局在を大きく減少させる結果となった。

【0077】実施例5 (形質膜におけるジストロフィン結合蛋白質の発現回復)
ジストロフィン-DAP複合体を形成するための鍵分子としてのジストロフィンの機能を評価するために、AxCAΔDysを導入後のmdx骨格筋の形質膜におけるDAPsの発現を調べた。mdx骨格筋では、DAPsの発現が減少している (オーレンディックら、ジャーナル オブ セル バイオロジー、115巻、1685-1694頁 (1991年) [Ohlendieck, K. and Campbell, K.P. (1991) J. Cell Biol. 115, 1685-1694.]) (図4参照) のに対して、AxCAΔDysH1以外のAxCAΔDysを導入した骨格筋では、ジストロフィン陽性繊維においてDAPsの形質膜での発現が、著しく回復した。

【0078】実施例6 (新生仔mdxマウス骨格筋に対するインビボ (in vivo) 遺伝子導入)
生後1週のmdxマウス一側後肢の腓腹筋中央部に、AxCAΔDysM3とAxCALacZの混合物6μlを直接導入した。4週間後、後肢の腓腹筋部の骨格筋を取り出し、H&E染色、X-Gal染色及びジストロフィン染色を行った。この結果、アデノウイルスを注入した側の後肢の腓腹筋群について、アデノウイルスベクターの導入を確認するために、X-Gal染色を行うと、腓腹筋群のうち浅指屈筋 (flexor digitorum superficialis) において、最も高率に、遺伝子を導入されている線維が認められた。このβ-Gal陽性領域についてジストロフィンの免疫染色を行ったところ、ほとんどの線維においてジストロフィンが発現していた。同部分について、H&E染色を行って詳しく観察したところ、非導

入側の浅指屈筋 (flexor digitorum superficialis) と

23

比較して、筋の変性・壊死像及び中心核線維数が著しく減少していた。

【0079】

【発明の効果】本発明の遺伝子及び筋ジストロフィーの遺伝子治療用の遺伝子導入媒体を用いることにより、よ*

配列番号：1

配列の長さ：3748

配列の型：核酸

鎖の数：両形態 (both)

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列の特徴：active-site

配列

CGGCCGCTCT AGAGGATCCC CGGGTACGGA GCTCGAATTC CGGAACCTCC GGAGAAAAAC 60
 GAATAGGAAA AACTGAAGTG TTAAGCTGCT GAAGTTTGTG GGTTCCTCAT 120
 TGTTTTAAAG CCTACTGGAG CAATAAGTT TGAAGAACTT TTACCAGTT TTTTATATCG 180
 CTGCCTTGAT ATACACTTTT CAAAATGCTT TGGTGGGAAG AAGTAGAGGA CTGTTATGAA 240
 AGAGAAGATG TTCAAAAGAA AACATTCACA AAATGGGTAA ATGCACAATT TTCTAAGTTT 300
 GGGAAAGCAGC ATATTGAGAA CCTCTTCAGT GACCTACAGG ATGGGAGGCG CCTCCTAGAC 360
 CTCCTCGAAG GCCTGACAGG GCAAAAAGCTG CCAAAAGAAA AAGGATCCAC AAGAGTTCAT 420
 GCCCTGAACA ATGTCAACAA GGCCTGCGG GTTTTGCGA ACAATAATGT TGATTAGTG 480
 AATATTGGAA GTACTGACAT CGTAGATGGA AATCATAAAC TGACTCTGG TTTGATTGG 540
 AATATAATCC TCCACTGGCA GGTCAAAAAT GTAATGAAAA ATATCATGGC TGGATTGCAA 600
 CAAACCAACA GTGAAAAGAT TCTCCTGAGC TGGGTCCGAC AATCAACTCG TAATTATCCA 660
 CAGGTTAATG TAATCAACTT CACCACCAGC TGGTCTGATG GCCTGGCTTT GAATGCTCTC 720
 ATCCATAGTC ATAGGCCAGA CCTATTGAC TGAATAGTG TGGTTTGCCA GCAGTCAGCC 780
 ACACAAGGAC TGAACATGC ATTCAACATC GCCAGATATC AATTAGGCAT AGAGAACTA 840
 CTCGATCCTG AAGATGTTGA TACCACCTAT CCAGATAAGA AGTCCATCTT AATGTACATC 900
 ACATCACTCT TCCAAGTTT GCCTCAACAA GTGAGCATTG AAGCCATCCA GGAAGTGGA 960
 ATGTTGCCAA GGCCACCTAA AGTGACTAAA GAAGAACATT TTCAGTTACA TCATCAAATG 1020
 CACTATTCTC AACAGATCAC GGTCACTCTA GCACAGGGAT ATGAGAGAAC TTCTTCCCCT 1080
 AAGCCTCGAT TCAAGAGCTA TGCCTACACA CAGGCTGCTT ATGTACCAC CTCTGACCCT 1140
 ACACGGAGCC CATTCCTTC ACAGCATTTG GAAGCTCTG AAGACAAGTC ATTTGGCAGT 1200
 TCATTGATGG AGAGTGAAGT AAACCTGGAC CGTTATCAAA CAGCTTTAGA AGAAGTATTA 1260

TCTGTGGCTC TTTCTGCTGA GGACACATTG CAAGCACAAG GAGAGATTTT TAATGATGTG 1320
 GAAGTGGTGA AAGACCAGTT TCATACTCAT GAGGGGTACA TGATGGATTT GACAGCCCAT 1380
 CAGGGCCGGG TTGGTAATAT TCTACAATTG GGAAGTAAGC TGATTGGAAC AGGAAAATTA 1440
 TCAGAAGATG AAGAACTGA AGTACAAGAG CAGATGAATC TCCTAAATTC AAGATGGAAG 1500
 CTTCTGCAGG TGGCCGTCGA GGACCGAGTC AGGCAGCTGC ATGAAGCCCA CAGGGACTTT 1560
 GGTCCAGCAT CTCAGCACTT TCTTCCACG TCTGTCCAGG GTCCCTGGGA GAGAGCCATC 1620
 TCGCCAAACA AAGTGCCCTA CTATATCAAC CACGAGACTC AAACAACCTG CTGGGACCAT 1680
 CCCAAAATGA CAGAGCTCTA CCAGTCTTTA GCTGACCTGA ATAATGTCAG ATTCTCAGCT 1740
 TATAGGACTG CCATGAACT CCGAAGACTG CAGAAGGCC TTTGCTTGA TCTCTTGAGC 1800
 CTGTCAGCTG CATGTGATGC CTTGGACCAG CACAACCTCA AGCAAAATGA CCAGCCCATG 1860
 GATATCCTGC AGATTATTA TTTGTTGACC ACTATTTATG ACOGCTGGA GCAAGAGCAC 1920
 AACAAATTTG TCAACGTCCC TCTCTGCGT GATATGTGTC TGAAGTGGCT GCTGAATGTT 1980
 TATGATACGG GACGAACAGG GAGGATCGT GTCCTGTCTT TTAAGTGG CATCATTTCC 2040
 CTGTGTAAG CACATTTGGA AGACAAGTAC AGATACCTTT TCAAGCAAGT GGCAAGTTCA 2100
 ACAGGATTTT GTGACCAGCG CAGGCTGGGC CTCCTTCTGC ATGATTCTAT CCAAATTTCA 2160

24

*り免疫反応の少ない筋ジストロフィーの遺伝子治療ができるようになる。

【0080】

【配列表】

25

AGACAGTTGG GTGAAGTTGC ATCCTTTGGG GGCAGTAACA TTGAGCCAAG TGTCCGGAGC 2220
 TGCTTCCAAT TTGCTAATAA TAAGCCAGAG ATCGAAGCGG CCCTCTTCT AGACTGGATG 2280
 AGACTGGAAC CCCAGTCCAT GGTGTGGCTG CCCGTCCTGC ACAGAGTGGC TGCTGCAGAA 2340
 ACTGCCAAGC ATCAGGCCAA ATGTAACATC TGCAAGAGT GTCCAATCAT TGGATTGAGG 2400
 TACAGGAGTC TAAAGCACTT TAATTATGAC ATCTGCCAAA GCTGCTTTTT TTCTGGTCGA 2460
 GTTGCAAAAG GCCATAAAAT GCACTATCCC ATGGTGGAAT ATTGCACTCC GACTACATCA 2520
 GGAGAAGATG TTCGAGACTT TGCCAAGGTA CTAATAAACA AATTTGGAAC CAAAAGGTAT 2580
 TTTGCGAAGC ATCCCGAAT GGGCTACCTG CCAGTGCAGA CTGTCTTAGA GGGGGACAAC 2640
 ATGGAAGTCC CCGTTACTCT GATCAACTTC TGGCCAGTAG ATTCTGCGCC TGCTCGTCC 2700
 CCTCAGCTTT CACACGATGA TACTCATTCA CGCATTGAAC ATTATGCTAG CAGGCTAGCA 2760
 GAAATGGAAA ACAGCAATGG ATCTTATCTA AATGATAGCA TCTCTCTAA TGAGAGCATA 2820
 GATGATGAAC ATTTGTTAAT CCAGCATTAC TGCCAAGTT TGAACCAGGA CTCCCCCTG 2880
 AGCCAGCCTC GTAGTCTGC CCAGATCTTG ATTTCTTAG AGAGTGAGGA AAGAGGGGAG 2940
 CTAGAGAGAA TCCTAGCAGA TCTTGAGGAA GAAAACAGGA ATCTGCAAGC AGAATATGAC 3000

CGTCTAAAGC AGCAGCACGA ACATAAAGGC CTGTCCCCAC TGCCGTCGCC TCCTGAAATG 3060
 ATGCCACCT CTCGCCAGAG TCCCGGGAT GCTGAGCTCA TTGCTGAGGC CAAGCTACTG 3120
 CGTCAACAC AAAGGCGGCC TGAAGCCAG GATGCAAATC CTGGAAGACC ACAATAACAG 3180
 CTGGAGTCA CAGTTACACA GGCTAAGGCA GCTGCTGGAG CAACCCAGG CAGAGGCCAAA 3240
 GTGAATGGC ACAACGGTGT CCTCTCTTC TACCTCTTA CAGAGGTCG ACAGCAGTCAG 3300
 CCTATGCTG CTCGAGTGG TTGGCAGTCA AACTTCGGAC TCCATGGGTG AGGAAGATCTT 3360
 CTCAGTCT CCCAGGACA CAAGCACAGG GTTAGAGGAG GTGATGGAGC AACTCAACAAC 3420
 TCCTTCCTT AGTTCAAGAG GAAGAAATAC CCCTGGAAAG CCAATGAGAG AGGACACAATG 3480
 TAGGAAGTC TTTCCACAT GGCAGATGAT TTGGGCAGAG CGATGGAGTC CTTAGTATCAG 3540
 TCATGACAG ATGAAGAAGG AGCAGAATAA ATGTTTACA ACTCCTGATT CCGCATGGTT 3600
 TTTATAATA TTCATACAAC AAAGAGGATT AGACAGTAAG AGTTTACAAG AAATAAATCTA 3660
 TATTTTGT GAAGGGTAGT GGTATTATAC TGTAGATTTC AGTAGTTTCT AAGTCTGTTAT 3720
 GTTTGTGTG GGGATCCTCT AGAGTCGA 3748

配列番号: 2

配列の長さ: 1092

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: タンパク質

配列

Met Leu Trp Trp Glu Glu Val Glu Asp Cys Tyr Glu Arg Glu Asp 15
 Val Gln Lys Lys Thr Phe Thr Lys Trp Val Asn Ala Gln Phe Ser 30
 Lys Phe Gly Lys Gln His Ile Glu Asn Leu Phe Ser Asp Leu Gln 45
 Asp Gly Arg Arg Leu Leu Asp Leu Leu Glu Gly Leu Thr Gly Gln 60
 Lys Leu Pro Lys Glu Lys Gly Ser Thr Arg Val His Ala Leu Asn 75
 Asn Val Asn Lys Ala Leu Arg Val Leu Gln Asn Asn Asn Val Asp 90
 Leu Val Asn Ile Gly Ser Thr Asp Ile Val Asp GlyA sn His Lys 105
 Leu Thr Leu Gly Leu Ile Trp Asn Ile Ile Leu His Trp Gln Val 120
 Lys Asn Val Met Lys Asn Ile Met Ala Gly Leu Gln Gln Thr Asn 135
 Ser Glu Lys Ile Leu Leu Ser Trp Val Arg Gln Ser Thr Arg Asn 150
 Tyr Pro Gln Val Asn Val Ile Asn Phe Thr Thr Ser Trp Ser Asp 165
 Gly Leu Ala Leu Asn Ala Leu Ile His Ser His Arg Pro Asp Leu 180

Phe Asp Trp Asn Ser Val Val Cys Gln Gln Ser Ala Thr Gln Arg 195
 Leu Glu His Ala Phe Asn Ile Ala Arg Tyr Gln Leu Gly Ile Glu 210
 Lys Leu Leu Asp Pro Glu Asp Val Asp Thr Thr Tyr Pro Asp Lys 225

27

Lys Ser Ile Leu Met Tyr Ile Thr Ser Leu Phe Gln Val Leu Pro	240
Gln Gln Val Ser Ile Glu Ala Ile Gln Glu Val Glu Met Leu Pro	255
Arg Pro Pro Lys Val Thr Lys Glu Glu His Phe Gln Leu His His	270
Gln Met His Tyr Ser Gln Gln Ile Thr Val Ser Leu Ala Gln Gly	285
Tyr Glu Arg Thr Ser Ser Pro Lys Pro Arg Phe Lys Ser Tyr Ala	300
Tyr Thr Gln Ala Ala Tyr Val Thr Thr Ser Asp Pro Thr Arg Ser	315
Pro Phe Pro Ser Gln His Leu Glu Ala Pro Glu Asp Lys Ser Phe	330
Gly Ser Ser Leu Met Glu Ser Glu Val Asn Leu Asp Arg Tyr Gln	345
Thr Ala Leu Glu Glu Val Leu Ser Trp Leu Leu Ser Ala Glu Asp	360
Thr Leu Gln Ala Gln Gly Glu Ile Ser Asn Asp Val Glu Val Val	375
Lys Asp Gln Phe His Thr His Glu Gly Tyr Met Met Asp Leu Thr	390
Ala His Gln Gly Arg Val Gly Asn Ile Leu Gln Leu Gly Ser Lys	405
Leu Ile Gly Thr Gly Lys Leu Ser Glu Asp Glu Glu Thr Glu Val	420
Gln Glu Gln Met Asn Leu Leu Asn Ser Arg Trp Lys Leu Leu Gln	435
Val Ala Val Glu Asp Arg Val Arg Gln Leu His Glu Ala His Arg	450
Asp Phe Gly Pro Ala Ser Gln His Phe Leu Ser Thr Ser Val Gln	465
Gly Pro Trp Glu Arg Ala Ile Ser Pro Asn Lys Val Pro Tyr Tyr	480
Ile Asn His Glu Thr Gln Thr Thr Cys Trp Asp His Pro Lys Met	495
Thr Glu Leu Tyr Gln Ser Leu Ala Asp Leu Asn Asn Val Arg Phe	510
Ser Ala Tyr Arg Thr Ala Met Lys Leu Arg Arg Leu Gln Lys Ala	525
Leu Cys Leu Asp Leu Leu Ser Leu Ser Ala Ala Cys Asp Ala Leu	540
Asp Gln His Asn Leu Lys Gln Asn Asp Gln Pro Met Asp Ile Leu	555
Gln Ile Ile Asn Cys Leu Thr Thr Ile Tyr Asp Arg Leu Glu Gln	570
Glu His Asn Asn Leu Val Asn Val Pro Leu Cys Val Asp Met Cys	585
Leu Asn Trp Leu Leu Asn Val Tyr Asp Thr Gly Arg Thr Gly Arg	600
Ile Arg Val Leu Ser Phe Lys Thr Gly Ile Ile Ser Leu Cys Lys	615
Ala His Leu Glu Asp Lys Tyr Arg Tyr Leu Phe Lys Gln Val Ala	630
Ser Ser Thr Gly Phe Cys Asp Gln Arg Arg Leu Gly Leu Leu Leu	645
His Asp Ser Ile Gln Ile Pro Arg Gln Leu Gly Glu Val Ala Ser	660
Phe Gly Gly Ser Asn Ile Glu Pro Ser Val Arg Ser Cys Phe Gln	675
Phe Ala Asn Asn Lys Pro Glu Ile Glu Ala Ala Leu Phe Leu Asp	690
Trp Met Arg Leu Glu Pro Gln Ser Met Val Trp Leu Pro Val Leu	705
His Arg Val Ala Ala Ala Glu Thr Ala Lys His Gln Ala Lys Cys	720
Asn Ile Cys Lys Glu Cys Pro Ile Ile Gly Phe Arg Tyr Arg Ser	735
Leu Lys His Phe Asn Tyr Asp Ile Cys Gln Ser Cys Phe Phe Ser	750
Gly Arg Val Ala Lys Gly His Lys Met His Tyr Pro Met Val Glu	765
Tyr Cys Thr Pro Thr Thr Ser Gly Glu Asp Val Arg Asp Phe Ala	780
Lys Val Leu Lys Asn Lys Phe Arg Thr Lys Arg Tyr Phe Ala Lys	795
His Pro Arg Met Gly Tyr Leu Pro Val Gln Thr Val Leu Glu Gly	810
Asp Asn Met Glu Thr Pro Val Thr Leu Ile Asn Phe Trp Pro Val	825
Asp Ser Ala Pro Ala Ser Ser Pro Gln Leu Ser His Asp Asp Thr	840
His Ser Arg Ile Glu His Tyr Ala Ser Arg Leu Ala Glu Met Glu	855
Asn Ser Asn Gly Ser Tyr Leu Asn Asp Ser Ile Ser Pro Asn Glu	870
Ser Ile Asp Asp Glu His Leu Leu Ile Gln His Tyr Cys Gln Ser	885
Leu Asn Gln Asp Ser Pro Leu Ser Gln Pro Arg Ser Pro Ala Gln	900
Ile Leu Ile Ser Leu Glu Ser Glu Glu Arg Gly Glu Leu Glu Arg	915
Ile Leu Ala Asp Leu Glu Glu Glu Asn Arg Asn Leu Gln Ala Glu	930
Tyr Asp Arg Leu Lys Gln Gln His Glu His Lys Gly Leu Ser Pro	945
Leu Pro Ser Pro Pro Glu Met Met Pro Thr Ser Pro Gln Ser Pro	960

29

Arg Asp Ala Glu Leu Ile Ala Glu Ala Lys Leu Leu Arg Gln His 975
 Lys Gly Arg Leu Glu Ala Arg Met Gln Ile Leu Glu Asp His Asn 990
 Lys Gln Leu Glu Ser Gln Leu His Arg Leu Arg Gln Leu Leu Glu 1005
 Gln Pro Gln Ala Glu Ala Lys Val Asn Gly Thr Thr Val Ser Ser 1020
 Pro Ser Thr Ser Leu Gln Arg Ser Asp Ser Ser Gln Pro Met Leu 1035
 Leu Arg Val Val Gly Ser Gln Thr Ser Asp Ser Met Gly Glu Glu 1050

Asp Leu Leu Ser Pro Pro Gln Asp Thr Ser Thr Gly Leu Glu Glu 1065
 Val Met Glu Gln Leu Asn Asn Ser Phe Pro Ser Ser Arg Gly Arg 1080
 Asn Thr Pro Gly Lys Pro Met Arg Glu Asp Thr Met 1092

配列番号: 3

配列の長さ: 4402

配列の型: 核酸

鎖の数: 両形態 (both)

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

配列の特徴: active-site

配列

CGGCCGCTCT AGAGGATCCC CGGGTACCGA GCTCGAATTC CGGAATCCC GGAGAAAAAC 60
 GAATAGGAAA AACTGAAGTG TTACTTTTTT TAAAGCTGCT GAAGTTTGTT GGTTCCTCAT 120
 TGTTTTAAAG CCTACTGGAG CAATAAAGTT TGAAGAACTT TTACCAGGTT TTTTATCG 180
 CTGCCTTGAT ATACACTTTT CAAAATGCTT TGGTGGGAAG AAGTAGAGGA CTGTATGAA 240
 AGAGAAGATG TTCAAAGAA AACATTCACA AAATGGGTAA ATGCACAATT TTCTAAGTTT 300
 GGGGAAGCAGC ATATTGAGAA CCTCTTCAGT GACCTACAGG ATGGGAGGCG CCTCCTAGAC 360
 CTCCTCGAAG GCCTGACAGG GCAAAAAGT CCAAAGAAA AAGGATCCAC AAGAGTTCAT 420
 GCCCTGAACA ATGTCAACAA GGCACTGGG GTTTTGAGA ACAATAATGT TGATTTAGTG 480
 AATATTGGAA GTACTGACAT CGTAGATGGA AATCATAAAC TGACTCTGG TTTGATTGG 540
 AATATAATCC TCCACTGGCA GGTCAAAAT GTAATGAAAA ATATCATGGC TGGATTGCAA 600
 CAAACCAACA GTGAAAAGAT TCTCCTGAGC TGGTCCGAC AATCAACTCG TAATTATCCA 660
 CAGGTTAATG TAATCAACTT CACCACCAGC TGGTCTGATG GCCTGGCTTT GAATGCTCTC 720
 ATCCATAGTC ATAGGCCAGA CCTATTGAC TGAATAGTG TGGTTTGCCA GCAGTCAGCC 780
 ACACAACGAC TGAACATGC ATTCAACATC GCCAGATATC AATTAGGCAT AGAGAACTA 840
 CTCGATCCTG AAGATGTTGA TACCACCTAT CCAGATAAGA AGTCCATCTT AATGTACATC 900
 ACATCACTCT TCCAAGTTT GCCTCAACAA GTGAGCATTG AAGCCATCCA GGAAGTGGAA 960
 ATGTTGCCAA GGCCACCTAA AGTGACTAAA GAAGAACATT TTCAGTTACA TCATCAAATG 1020
 CACTATTCTC AACAGATCAC GGTCACTCTA GCACAGGGAT ATGAGAGAAC TTCTCCCT 1080
 AAGCCTCGAT TCAAGAGCTA TGCCTACACA CAGGCTGCTT ATGTCACCAC CTCTGACCCT 1140
 ACACGGAGCC CATTCCTTC ACAGCATTG GAAGCTCCTG AAGACAAGTC ATTTGGCAGT 1200
 TCATTGATGG AGAGTGAAGT AAACCTGGAC CGTTATCAA CAGCTTTAGA AGAAGTATTA 1260

TCGTGGCTTC TTTCTGCTGA GGACACATTG CAAGCACAAG GAGAGATTTC TAATGATGTG 1320
 GAAGTGGTGA AAGACCAGTT TCATACTCAT GAGGGGTACA TGATGGATTT GACAGCCCAT 1380
 CAGGGCCGGG TTGGTAATAT TCTACAATTG GGAAGTAAGC TGATTGGAAC AGGAAAATTA 1440
 TCAGAAGATG AAGAACTGA AGTACAAGAG CAGATGAATC TCCTAAATTC AAGATGGGAA 1500
 TGCCTCAGG TAGCTAGCAT GGA AAAACAA AGCAATTTAC ATAGAGTTT AATGGATCTC 1560
 CAGAATCAGA AACTGAAAGA GTTGAATGAC TGGCTAACA AAACAGAAGA AAGAACAAGG 1620
 AAAATGGAGG AAGAGCCTCT TGGACCTGAT CTTGAAGACC TAAACGCCA AGTACAACAA 1680
 CATAAGGTGC TTCAAGAAGA TCTAGAACAA GAACAAGTCA GGTCAATTTCT CTAATCAC 1740
 ATGGTGGTGG TAGTTGATGA ATCTAGTGA GATCAACGAA CTGCTGCTTTG GAAGAACAA 1800
 CTTAAGGAGG TCAATACTGA GTGGGAAAAA TTGAACCTGC ACTCCGCTGAC TGGCAGAGA 1860

31

AAAATAGATG AGACCTTGA AAGACTCCAG GAACTTCAAG AGGCCACGGAT GAGCTGGAC 1920
 CTAAGCTGC GCCAAGCTGA GGTGATCAAG GGATCCTGGC AGCCCGTGGG GATCTCCTC 1980
 ATTGACTCTC TCCAAGATCA CCTCGAGAAA GTCAAGGCAC TTCGAGGAGAA ATTGCGCCT 2040
 CTGAAAGAGA ACGTGAGCCA CGTCAATGAC CTGCTCGCC AGCTTACCACT TTGGGCATT 2100
 CAGCTCTCAC CGTATAACCT CAGCACTCTG GAAGACCTGA ACACCAGATGG AAGCTTCTG 2160
 CAGGTGGCCG TCGAGGACCG AGTCAGGCAG CTGCATGAAG CCCACAGGGAC TTTGGTCCA 2220
 GCATCTCAGC ACTTCTTTC CAGTCTGTC CAGGGTCCCT GGGAGAGAGCC ATCTCGCCA 2280
 AACAAAGTGC CCTACTATAT CAACCACGAG ACTCAAACAA CTGCTGGGAC CATCCCAA 2340
 ATGACAGAGC TCTACCAGTC TTAGCTGAC CTGAATAATG TCAGATTCTCA GCTTATAGG 2400
 ACTGCCATGA AACTCOGAAG ACTGCAGAAG GCCCTTTGCT TGGATCTCTG AGCCTGTCA 2460
 GCTGCATGTG ATGCCTTGGG CCAGCACAACT CAAGCAAA ATGACCAGCCC ATGGATATC 2520
 CTGCAGATTA TTAATTGTTT GACCACTATT TATGACGCC TGGAGCAAGAG CACAACAAT 2580
 TTGGTCAACG TCCCTCTCTG CGTGGATATG TGTCTGAAT GGCTGCTGAAT GTTTATGAT 2640
 ACGGACGAA CAGGGAGGAT CCGTGTCTG TCTTTAAAA CTGGCATCATT TCCCTGTGT 2700
 AAAGCACATT TGAAGACAA GTACAGATAC CTTTCAAGC AAGTGGCAAGT TCAACAGGA 2760
 TTTTGTGACC AGCGCAGGCT GGGCTCCTT CTGCATGATT CTATCCAAAT CCAAGACAG 2820
 TTGGGTGAAG TTGCATCCTT TGGGGCAGT AACATTGAGC CAAGTGTCCG AGCTGCTTC 2880
 CAATTTGCTA ATAATAAGCC AGAGATCGAA GCGGCCCTCT TCCTAGACTGG ATGAGACTG 2940
 GAACCCAGT CCATGGTGTG GCTGCCCGTC CTGCACAGAG TGGCTGCTGCA GAAACTGCC 3000

AAGCATCAGG CCAATGTAA CATCTGCAA GAGTGTCAA TCATTGGATTC AGGTACAGG 3060
 AGTCTAAGC ACTTTAATTA TGACATCTGC CAAAGCTGCT TTTTCTGGT CGAGTTGCA 3120
 AAAGGCCATA AATGCACTA TCCCATGGT GAATATTGCA CTCGACTACA TCAGGAGAA 3180
 GATGTTGAG ACTTTGCCAA GGTACTAAA AACAAATTC GAACCAAAAGG TATTTGCG 3240
 AAGCATCCCC GAATGGGCTA CCTGCCAGT CAGACTGTCT TAGAGGGGAC AACATGGAA 3300
 ACTCCCGTTA CTCTGATCAA CTTCTGGCCA GTAGATTCTG CGCTGCCTCG TCCCTCAG 3360
 CTTTACACG ATGATACTCA TTCACGCATT GAACATTATG CTAGCAGGCTA GCAGAAATG 3420
 GAAAACAGCA ATGGATCTTA TCTAAATGAT AGCATCTCTC CTAATGAGAGC ATAGATGAT 3480
 GAACATTTGT TAATCCAGCA TTAGTCCAA AGTTTGAACC AGGACTCCCC CTGAGCCAG 3540
 CCTCGTAGTC CTGCCAGAT CTTGATTCC TTAGAGAGTG AGGAAAGAGG GAGCTAGAG 3600
 AGAATCCTAG CAGATCTTGA GGAAGAAAAC AGGAATCTGC AAGCAGAATAT GACCGTCTA 3660
 AAGCAGCAGC ACGAACATAA AGGCCTGTCC CCACTGCCGT CCCCTCTGAA ATGATGCCC 3720
 ACCTCTCCCC AGAGTCCCG GGATGCTGAG CTCATTGCTG AGGCCAAGCTA CTGCGTCAA 3780
 CACAAAGGCC GCCTGGAAGC CAGGATGCAA ATCCTGGAAG ACCACAATAA CAGCTGGAG 3840
 TCACAGTTAC ACAGGCTAAG GCAGCTGCTG GAGCAACCC AGGCAGAGGCC AAAGTGAAT 3900
 GGCACAACGG TGTCTCTCC TTCTACCTCT CTACAGAGGT CCGACAGCAGT CAGCCTATG 3960
 CTGCTCGAG TGGTTGGCAG TCAAATTCG GACTCCATGG GTGAGGAAGAT CTTCTCAGT 4020
 CCTCCCCAGG ACACAAGCAC AGGGTTAGAG GAGGTGATGG AGCAACTCAAC AACTCCTTC 4080
 CCTAGTTCAA GAGGAAGAAA TACCCCTGGA AAGCCAATGA GAGAGGACACA ATGTAGGAA 4140
 GTCTTTTCCA CATGGCAGAT GATTTGGGCA GAGCGATGGA GTCCTTAGTAT CAGTCATGA 4200
 CAGATGAAGA AGGAGCAGAA TAAATGTTT ACAACTCCTG ATTCCCGCATG GTTTTATA 4260
 ATATTCATAC AACAAAGAGG ATTAGACAGT AAGAGTTTAC AAGAAATAAT CTATATTT 4320
 TGTGAAGGT AGTGGTATTA TACTGTAGAT TTCAGTAGTT TCTAAGTCTGT TATTGTTT 4380
 GTTGGGGATC CTCTAGAGTC GA 4402

配列番号: 4

配列の長さ: 1310

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: タンパク質

配列

33

Met Leu Trp Trp Glu Glu Val Glu Asp Cys Tyr Glu Arg Glu Asp	15
Val Gln Lys Lys Thr Phe Thr Lys Trp Val Asn Ala Gln Phe Ser	30
Lys Phe Gly Lys Gln His Ile Glu Asn Leu Phe Ser Asp Leu Gln	45
Asp Gly Arg Arg Leu Leu Asp Leu Leu Glu Gly Leu Thr Gly Gln	60
Lys Leu Pro Lys Glu Lys Gly Ser Thr Arg Val His Ala Leu Asn	75
Asn Val Asn Lys Ala Leu Arg Val Leu Gln Asn Asn Asn Val Asp	90
Leu Val Asn Ile Gly Ser Thr Asp Ile Val Asp Gly Asn His Lys	105
Leu Thr Leu Gly Leu Ile Trp Asn Ile Ile Leu His Trp Gln Val	120
Lys Asn Val Met Lys Asn Ile Met Ala Gly Leu Gln Gln Thr Asn	135
Ser Glu Lys Ile Leu Leu Ser Trp Val Arg Gln Ser Thr Arg Asn	150
Tyr Pro Gln Val Asn Val Ile Asn Phe Thr Thr Ser Trp Ser Asp	165
Gly Leu Ala Leu Asn Ala Leu Ile His Ser His Arg Pro Asp Leu	180
Phe Asp Trp Asn Ser Val Val Cys Gln Gln Ser Ala Thr Gln Arg	195
Leu Glu His Ala Phe Asn Ile Ala Arg Tyr Gln Leu Gly Ile Glu	210
Lys Leu Leu Asp Pro Glu Asp Val Asp Thr Thr Tyr Pro Asp Lys	225
Lys Ser Ile Leu Met Tyr Ile Thr Ser Leu Phe Gln Val Leu Pro	240
Gln Gln Val Ser Ile Glu Ala Ile Gln Glu Val Glu Met Leu Pro	255
Arg Pro Pro Lys Val Thr Lys Glu Glu His Phe Gln Leu His His	270
Gln Met His Tyr Ser Gln Gln Ile Thr Val Ser Leu Ala Gln Gly	285
Tyr Glu Arg Thr Ser Ser Pro Lys Pro Arg Phe Lys Ser Tyr Ala	300
Tyr Thr Gln Ala Ala Tyr Val Thr Thr Ser Asp Pro Thr Arg Ser	315
Pro Phe Pro Ser Gln His Leu Glu Ala Pro Glu Asp Lys Ser Phe	330
Gly Ser Ser Leu Met Glu Ser Glu Val Asn Leu Asp Arg Tyr Gln	345
Thr Ala Leu Glu Glu Val Leu Ser Trp Leu Leu Ser Ala Glu Asp	360
Thr Leu Gln Ala Gln Gly Glu Ile Ser Asn Asp Val Glu Val Val	375
Lys Asp Gln Phe His Thr His Glu Gly Tyr Met Met Asp Leu Thr	390
Ala His Gln Gly Arg Val Gly Asn Ile Leu Gln Leu Gly Ser Lys	405
Leu Ile Gly Thr Gly Lys Leu Ser Glu Asp Glu Glu Thr Glu Val	420
Gln Glu Gln Met Asn Leu Leu Asn Ser Arg Trp Glu Cys Leu Arg	435
Val Ala Ser Met Glu Lys Gln Ser Asn Leu His Arg Val Leu Met	450
Asp Leu Gln Asn Gln Lys Leu Lys Glu Leu Asn Asp Trp Leu Thr	465
Lys Thr Glu Glu Arg Thr Arg Lys Met Glu Glu Glu Pro Leu Gly	480
Pro Asp Leu Glu Asp Leu Lys Arg Gln Val Gln Gln His Lys Val	495
Leu Gln Glu Asp Leu Glu Gln Glu Gln Val Arg Val Asn Ser Leu	510
Thr His Met Val Val Val Val Asp Glu Ser Ser Gly Asp His Ala	525

Thr Ala Ala Leu Glu Glu Gln Leu Lys Glu Val Asn Thr Glu Trp	540
Glu Lys Leu Asn Leu His Ser Ala Asp Trp Gln Arg Lys Ile Asp	555
Glu Thr Leu Glu Arg Leu Gln Glu Leu Gln Glu Ala Thr Asp Glu	570
Leu Asp Leu Lys Leu Arg Gln Ala Glu Val Ile Lys Gly Ser Trp	585
Gln Pro Val Gly Asp Leu Leu Ile Asp Ser Leu Gln Asp His Leu	600
Glu Lys Val Lys Ala Leu Arg Gly Glu Ile Ala Pro Leu Lys Glu	615
Asn Val Ser His Val Asn Asp Leu Ala Arg Gln Leu Thr Thr Leu	630
Gly Ile Gln Leu Ser Pro Tyr Asn Leu Ser Thr Leu Glu Asp Leu	645
Asn Thr Arg Trp Lys Leu Leu Gln Val Ala Val Glu Asp Arg Val	660
Arg Gln Leu His Glu Ala His Arg Asp Phe Gly Pro Ala Ser Gln	675
His Phe Leu Ser Thr Ser Val Gln Gly Pro Trp Glu Arg Ala Ile	690
Ser Pro Asn Lys Val Pro Tyr Tyr Ile Asn His Glu Thr Gln Thr	705
Thr Cys Trp Asp His Pro Lys Met Thr Glu Leu Tyr Gln Ser Leu	720
Ala Asp Leu Asn Asn Val Arg Phe Ser Ala Tyr Arg Thr Ala Met	735
Lys Leu Arg Arg Leu Gln Lys Ala Leu Cys Leu Asp Leu Leu Ser	750
Leu Ser Ala Ala Cys Asp Ala Leu Asp Gln His Asn Leu Lys Gln	765
Asn Asp Gln Pro Met Asp Ile Leu Gln Ile Ile Asn Cys Leu Thr	780
Thr Ile Tyr Asp Arg Leu Glu Gln Glu His Asn Asn Leu Val Asn	795
Val Pro Leu Cys Val Asp Met Cys Leu Asn Trp Leu Leu Asn Val	810
Tyr Asp Thr Gly Arg Thr Gly Arg Ile Arg Val Leu Ser Phe Lys	825
Thr Gly Ile Ile Ser Leu Cys Lys Ala His Leu Glu Asp Lys Tyr	840
Arg Tyr Leu Phe Lys Gln Val Ala Ser Ser Thr Gly Phe Cys Asp	855
Gln Arg Arg Leu Gly Leu Leu Leu His Asp Ser Ile Gln Ile Pro	870
Arg Gln Leu Gly Glu Val Ala Ser Phe Gly Gly Ser Asn Ile Glu	885
Pro Ser Val Arg Ser Cys Phe Gln Phe Ala Asn Asn Lys Pro Glu	900
Ile Glu Ala Ala Leu Phe Leu Asp Trp Met Arg Leu Glu Pro Gln	915

Ser Met Val Trp Leu Pro Val Leu His Arg Val Ala Ala Ala Glu	930
Thr Ala Lys His Gln Ala Lys Cys Asn Ile Cys Lys Glu Cys Pro	945
Ile Ile Gly Phe Arg Tyr Arg Ser Leu Lys His Phe Asn Tyr Asp	960
Ile Cys Gln Ser Cys Phe Phe Ser Gly Arg Val Ala Lys Gly His	975
Lys Met His Tyr Pro Met Val Glu Tyr Cys Thr Pro Thr Thr Ser	990
Gly Glu Asp Val Arg Asp Phe Ala Lys Val Leu Lys Asn Lys Phe	1005
Arg Thr Lys Arg Tyr Phe Ala Lys His Pro Arg Met Gly Tyr Leu	1020
Pro Val Gln Thr Val Leu Glu Gly Asp Asn Met Glu Thr Pro Val	1035
Thr Leu Ile Asn Phe Trp Pro Val Asp Ser Ala Pro Ala Ser Ser	1050
Pro Gln Leu Ser His Asp Asp Thr His Ser Arg Ile Glu His Tyr	1065
Ala Ser Arg Leu Ala Glu Met Glu Asn Ser Asn Gly Ser Tyr Leu	1080
Asn Asp Ser Ile Ser Pro Asn Glu Ser Ile Asp Asp Glu His Leu	1095
Leu Ile Gln His Tyr Cys Gln Ser Leu Asn Gln Asp Ser Pro Leu	1110
Ser Gln Pro Arg Ser Pro Ala Gln Ile Leu Ile Ser Leu Glu Ser	1125
Glu Glu Arg Gly Glu Leu Glu Arg Ile Leu Ala Asp Leu Glu Glu	1140
Glu Asn Arg Asn Leu Gln Ala Glu Tyr Asp Arg Leu Lys Gln Gln	1155
His Glu His Lys Gly Leu Ser Pro Leu Pro Ser Pro Pro Glu Met	1170
Met Pro Thr Ser Pro Gln Ser Pro Arg Asp Ala Glu Leu Ile Ala	1185
Glu Ala Lys Leu Leu Arg Gln His Lys Gly Arg Leu Glu Ala Arg	1200
Met Gln Ile Leu Glu Asp His Asn Lys Gln Leu Glu Ser Gln Leu	1215
His Arg Leu Arg Gln Leu Leu Glu Gln Pro Gln Ala Glu Ala Lys	1230
Val Asn Gly Thr Thr Val Ser Ser Pro Ser Thr Ser Leu Gln Arg	1245
Ser Asp Ser Ser Gln Pro Met Leu Leu Arg Val Val Gly Ser Gln	1260
Thr Ser Asp Ser Met Gly Glu Glu Asp Leu Leu Ser Pro Pro Gln	1275
Asp Thr Ser Thr Gly Leu Glu Glu Val Met Glu Gln Leu Asn Asn	1290

39

Ser Phe Pro Ser Ser Arg Gly Arg Asn Thr Pro Gly Lys Pro Met

1305

Arg Glu Asp Thr Met ***

1310

配列番号: 5

配列の長さ: 4402

配列の型: 核酸

鎖の数: 両形態 (both)

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

配列の特徴: active-site

配列

CGGCCGCTCT AGAGGATCCC CGGGTACCGA GCTCGAATTC CGGAATCCC GGAGAAAAAC 60
 GAATAGGAAA AACTGAAGTG TTACTTTTTT TAAAGCTGCT GAAGTTTGTT GGTTCCTCAT 120
 TGTTTTTAAG CCTACTGGAG CAATAAAGTT TGAAGAACTT TTACCAGGTT TTTTATATCG 180
 CTGCGTTGAT ATACACTTTT CAAAATGCTT TGGTGGGAAG AAGTAGAGGA CTGTTATGAA 240
 AGAGAAGATG TTCAAAAGAA AACATTCAACA AAATGGGTAA ATGCACAATT TTCTAAGTTT 300
 GGGAGGCAGC ATATTGAGAA CCTCTTCAGT GACCTACAGG ATGGGAGGCG CCTCCTAGAC 360
 CTCCTCGAAG GCCTGACAGG GCAAAACTG CCAAAAGAAA AAGGATCCAC AAGAGTTCAT 420
 GCCCTGAACA ATGTCAACAA GGCCTGCGG GTTTTGCGA ACAATAATGT TGATTAGTG 480
 AATATTGGAA GTACTGACAT CGTAGATGGA AATCATAAAC TGACTCTGG TTTGATTGG 540
 AATATAATCC TCCACTGGCA GGTCAAAAT GTAATGAAAA ATATCATGGC TGGATTGCAA 600
 CAAACCAACA GTGAAAAGAT TCTCCTGAGC TGGGTCCGAC AATCAACTCG TAATTATCCA 660
 CAGGTTAATG TAATCAACTT CACCACCAGC TGGTCTGATG GCCTGGCTTT GAATGCTCTC 720
 ATCCATAGTC ATAGGCCAGA CCTATTGAC TGGAAATAGT TGGTTTGCCA GCAGTCAGCC 780
 ACACAACGAC TGGAACTGC ATTCAACATC GCCAGATATC AATTAGGCAT AGAGAACTA 840
 CTCGATCCTG AAGATGTGA TACCACCTAT CCAGATAAGA AGTCCATCTT AATGTACATC 900
 ACATCACTCT TCCAAGTTT GCCTCAACAA GTGAGCATTG AAGCCATCCA GGAAGTGGAA 960
 ATGTTGCCAA GGCCACCTAA AGTGAATAA GAAGAACATT TTCAGTTACA TCATCAAATG 1020
 CACTATTCTC AACAGATCAC GGTCACTTA GCACAGGGAT ATGAGAGAAC TTCTTCCCT 1080
 AAGCCTGAT TCAAGAGCTA TGCCTACACA CAGGCTGCTT ATGTACCAC CTCTGACCCT 1140
 ACACGGAGCC CATTTCTTC ACAGCATTTG GAAGCTCTG AAGACAAGTC ATTTGGCAGT 1200
 TCATTGATGG AGAGTGAAGT AAACCTGGAC CGTTATCAA CAGCTTTAGA AGAAGTATTA 1260
 TCGTGGCTTC TTTCTGCTGA GGACACATTG CAAGCACAAG GAGAGATTTC TAATGATGTG 1320
 GAAGTGGTGA AAGACCAGTT TCATACTCAT GAGGGGTACA TGATGGATTG GACAGCCCAT 1380
 CAGGGCGGG TTGTAATAT TCTACAATTG GGAAGTAAGC TGATTGGAAC AGGAAAATTA 1440

TCAGAAGATG AAGAACTGA AGTACAAGAG CAGATGAATC TCCTAAATTC AAGATGGGAA 1500
 TGCCTCAGGG TAGCTAGCAT GGAAAAACAA AGCAATTTAC ATAGAGTTT AATGGATCTC 1560
 CAGAATCAGA AACTGAAAGA GTTGAATGAC TGGCTAACAA AAACAGAAGA AAGAACAAGG 1620
 AAAATGGAGG AAGAGCCTCT TGGACCTGAT CTGGAAGACC TAAAAAGCCA AGTACAACAA 1680
 CATAAGGTGC TTCAAGAAGA TCTAGAACAA GAACAAGTCA GGTCAATTC TCTCACTCAC 1740
 ATGGTGGTGG TAGTTGATGA ATCTAGTGA GATCAGCAA CTGCTGCTTT GGAAGAACAA 1800
 CTTAAGGTAT TGGGAGATCG ATGGGCAAC ATCTGTAGAT GGACAGAAGA CGCTGGGT 1860
 CTTTTACAAG ACATCCTTCT CAAATGGCAA CGTCTACTG AAGAACAGTG CCTTTTAGT 1920
 GCATGGCTTT CAGAAAAAGA AGATGCAGTG AACAAGATTC ACACAAGTGG CTTTAAAGAT 1980
 CAAAATGAAA TGTATCAAG TCTCGAGAAA GTCAAGGCAC TCGAGGAGA AATTGCGCCT 2040
 CTGAAGAGA ACGTGAGCCA CGTCAATGAC CTTGCTGCC AGCTTACCAC TTTGGGCATT 2100
 CAGCTCTCAC CGTATAACCT CAGCACTCTG GAAGACCTGA ACACCAGATG GAAGCTTCTG 2160
 CAGGTGGCG TCGAGGACCG AGTCAGGCAG CTGCATGAAG CCCACAGGGA CTTTGGTCCA 2220

41

GCATCTCAGC ACTTCTTTC CAOGTCTGTC CAGGGTCCCT GGGAGAGAGC CATCTCGCCA 2280
 AACAAAGTGC CCTACTATAT CAACCACGAG ACTCAAACAA CTGCTGGGA CCATCCCAAA 2340
 ATGACAGAGC TCTACCAGTC TTAGCTGAC CTGAATAATG TCAGATTCTC AGCTTATAGG 2400
 ACTGCCATGA AACTCOGAAG ACTGCAGAAG GCCCTTTGCT TGGATCTCTT GAGCCTGTCA 2460
 GCTGCATGTG ATGCCTTGGA CCAGCACAAAC CTCAGCAAA ATGACCAGCC CATGGATATC 2520
 CTGCAGATTA TTAATTGTTT GACCACTATT TATGACCGCC TGGAGCAAGA GCACAACAAT 2580
 TTGGTCAACG TCCCTCTCTG CGTGGATATG TGTCTGAAC TGGCTGCTGAA TGTATTATGAT 2640
 ACGGGACGAA CAGGGAGGAT CCGTGTCTG TCTTTTAAAA CTGGCATCAT TTCCCTGTGT 2700
 AAAGCACATT TGGAGACAA GTACAGATAC CTTTCAAGC AAGTGGCAAG TTCAACAGGA 2760
 TTTTGTGACC AGCGCAGGCT GGGCCTCTT CTGCATGATT CTATCCAAAT TCCAAGACAG 2820
 TTGGGTGAAG TTGCATCCTT TGGGGCAGT AACATTGAGC CAAGTGTCCG GAGCTGCTTC 2880
 CAATTGCTA ATAATAAGCC AGAGATCGAA GCGGCCCTCT TCCTAGACTG GATGAGACTG 2940
 GAACCCAGT CCATGGTGTG GCTGCCCGTC CTGCACAGAG TGGCTGCTGC AGAAACTGCC 3000
 AAGCATCAGG CCAAATGTAA CATCTGCAAA GAGTGTCCAA TCATTGGATT CAGGTACAGG 3060
 AGTCTAAAGC ACTTTAATTA TGACATCTGC CAAAGCTGCT TTTTCTCTGG TCGAGTTGCA 3120
 AAAGGCCATA AAATGCACTA TCCCATGGTG GAATATTGCA CTCGACTAC ATCAGGAGAA 3180

GATGTTGAG ACTTTGCCAA GGTACTAAAA AACAAATTC GAACCAAAG GTATTTTGG 3240
 AAGCATCCCC GAATGGGCTA CTGCCCAGTG CAGACTGTCT TAGAGGGGA CAACATGGAA 3300
 ACTCCCGTTA CTCTGATCAA CTCTGGCCA GTAGATTCTG CGCTGCCTC GTCCCTCAG 3360
 CTTTACACG ATGATACTCA TTCAACGATT GAACATTATG CTAGCAGGCT AGCAGAAATG 3420
 GAAAACAGCA ATGGATCTTA TCTAAATGAT AGCATCTCTC CTATGAGAG CATAGATGAT 3480
 GAACATTTGT TAATCCAGCA TTAGTGCCAA AGTTTGAACC AGGACTCCCC CTGAGCCAG 3540
 CCTCGTAGTC CTGCCAGAT CTGATTTCC TTAGAGAGTG AGGAAAGAGG GGAGCTAGAG 3600
 AGAATCTAG CAGATCTGA GGAAGAAAAC AGGAATCTGC AAGCAGAATA TGACCGTCTA 3660
 AAGCAGCAGC ACGAACATAA AGGCCTGTCC CCACTGCCGT CCCCTCTGA AATGATGCCC 3720
 ACCTCTCCCC AGAGTCCCCG GGATGCTGAG CTCATTGCTG AGGCCAAGCT ACTGCGTCAA 3780
 CACAAAGGCC GCCTGGAAGC CAGGATGCAA ATCCTGGAAG ACCACAATAA ACAGCTGGAG 3840
 TCACAGTTAC ACAGGCTAAG GCAGCTGCTG GAGCAACCCC AGGCAGAGGC CAAAGTGAAT 3900
 GGCACAACGG TGTCTCTCC TTCTACCTCT CTACAGAGGT CCGACAGCAG TCAGCCTATG 3960
 CTGCTCOGAG TGGTTGGCAG TCAAACCTCG GACTCCATGG GTGAGGAAGA TCTTCTCAGT 4020
 CCTCCCCAGG ACACAAGCAC AGGGTTAGAG GAGGTGATGG AGCAACTCAA CAACTCCTTC 4080
 CCTAGTTCAA GAGGAAGAAA TACCCCTGGA AAGCCAATGA GAGAGGACAC AATGTAGGAA 4140
 GTCTTTTCCA CATGGCAGAT GATTGGGCA GAGCGATGGA GTCCTTAGTA TCAGTCATGA 4200
 CAGATGAAGA AGGAGCAGAA TAAATGTTTT ACAACTCCTG ATTCGCGCAT GGTTTTATA 4260
 ATATTCATAC AACAAAGAGG ATTAGACAGT AAGAGTTTAC AAGAAATAA TCTATATTTT 4320
 TGTGAAGGGT AGTGGTATTA TACTGTAGAT TTCAGTAGTT TCTAAGCTG TTATTGTTTT 4380
 GTTGGGGATC CTCTAGAGTC GA 4402

配列番号: 6

配列の長さ: 1310

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: タンパク質

配列

Met Leu Trp Trp Glu Glu Val Glu Asp Cys Tyr Glu Arg Glu Asp 15
 Val Gln Lys Lys Thr Phe Thr Lys Trp Val Asn Ala Gln Phe Ser 30
 Lys Phe Gly Lys Gln His Ile Glu Asn Leu Phe Ser Asp Leu Gln 45
 Asp Gly Arg Arg Leu Leu Asp Leu Leu Glu Gly Leu Thr Gly Gln 60

Lys Leu Pro Lys Glu Lys Gly Ser Thr Arg Val His Ala Leu Asn 75

43

Asn Val Asn Lys Ala Leu Arg Val Leu Gln Asn Asn Asn Val Asp	90
Leu Val Asn Ile Gly Ser Thr Asp Ile Val Asp Gly Asn His Lys	105
Leu Thr Leu Gly Leu Ile Trp Asn Ile Ile Leu His Trp Gln Val	120
Lys Asn Val Met Lys Asn Ile Met Ala Gly Leu Gln Gln Thr Asn	135
Ser Glu Lys Ile Leu Leu Ser Trp Val Arg Gln Ser Thr Arg Asn	150
Tyr Pro Gln Val Asn Val Ile Asn Phe Thr Thr Ser Trp Ser Asp	165
Gly Leu Ala Leu Asn Ala Leu Ile His Ser His Arg Pro Asp Leu	180
Phe Asp Trp Asn Ser Val Val Cys Gln Gln Ser Ala Thr Gln Arg	195
Leu Glu His Ala Phe Asn Ile Ala Arg Tyr Gln Leu Gly Ile Glu	210
Lys Leu Leu Asp Pro Glu Asp Val Asp Thr Thr Tyr Pro Asp Lys	225
Lys Ser Ile Leu Met Tyr Ile Thr Ser Leu Phe Gln Val Leu Pro	240
Gln Gln Val Ser Ile Glu Ala Ile Gln Glu Val Glu Met Leu Pro	255
Arg Pro Pro Lys Val Thr Lys Glu Glu His Phe Gln Leu His His	270
Gln Met His Tyr Ser Gln Gln Ile Thr Val Ser Leu Ala Gln Gly	285
Tyr Glu Arg Thr Ser Ser Pro Lys Pro Arg Phe Lys Ser Tyr Ala	300
Tyr Thr Gln Ala Ala Tyr Val Thr Thr Ser Asp Pro Thr Arg Ser	315
Pro Phe Pro Ser Gln His Leu Glu Ala Pro Glu Asp Lys Ser Phe	330
Gly Ser Ser Leu Met Glu Ser Glu Val Asn Leu Asp Arg Tyr Gln	345
Thr Ala Leu Glu Glu Val Leu Ser Trp Leu Leu Ser Ala Glu Asp	360
Thr Leu Gln Ala Gln Gly Glu Ile Ser Asn Asp Val Glu Val Val	375
Lys Asp Gln Phe His Thr His Glu Gly Tyr Met Met Asp Leu Thr	390
Ala His Gln Gly Arg Val Gly Asn Ile Leu Gln Leu Gly Ser Lys	405
Leu Ile Gly Thr Gly Lys Leu Ser Glu Asp Glu Glu Thr Glu Val	420
Gln Glu Gln Met Asn Leu Leu Asn Ser Arg Trp Glu Cys Leu Arg	435
Val Ala Ser Met Glu Lys Gln Ser Asn Leu His Arg Val Leu Met	450
Asp Leu Gln Asn Gln Lys Leu Lys Glu Leu Asn Asp Trp Leu Thr	465
Lys Thr Glu Glu Arg Thr Arg Lys Met Glu Glu Glu Pro Leu Gly	480
Pro Asp Leu Glu Asp Leu Lys Arg Gln Val Gln Gln His Lys Val	495
Leu Gln Glu Asp Leu Glu Gln Glu Gln Val Arg Val Asn Ser Leu	510
Thr His Met Val Val Val Val Asp Glu Ser Ser Gly Asp His Ala	525
Thr Ala Ala Leu Glu Glu Gln Leu Lys Val Leu Gly Asp Arg Trp	540
Ala Asn Ile Cys Arg Trp Thr Glu Asp Arg Trp Val Leu Leu Gln	555
Asp Ile Leu Leu Lys Trp Gln Arg Leu Thr Glu Glu Gln Cys Leu	570
Phe Ser Ala Trp Leu Ser Glu Lys Glu Asp Ala Val Asn Lys Ile	585
His Thr Thr Gly Phe Lys Asp Gln Asn Glu Met Leu Ser Ser Leu	600
Glu Lys Val Lys Ala Leu Arg Gly Glu Ile Ala Pro Leu Lys Glu	615
Asn Val Ser His Val Asn Asp Leu Ala Arg Gln Leu Thr Thr Leu	630
Gly Ile Gln Leu Ser Pro Tyr Asn Leu Ser Thr Leu Glu Asp Leu	645
Asn Thr Arg Trp Lys Leu Leu Gln Val Ala Val Glu Asp Arg Val	660
Arg Gln Leu His Glu Ala His Arg Asp Phe Gly Pro Ala Ser Gln	675
His Phe Leu Ser Thr Ser Val Gln Gly Pro Trp Glu Arg Ala Ile	690
Ser Pro Asn Lys Val Pro Tyr Tyr Ile Asn His Glu Thr Gln Thr	705
Thr Cys Trp Asp His Pro Lys Met Thr Glu Leu Tyr Gln Ser Leu	720
Ala Asp Leu Asn Asn Val Arg Phe Ser Ala Tyr Arg Thr Ala Met	735
Lys Leu Arg Arg Leu Gln Lys Ala Leu Cys Leu Asp Leu Leu Ser	750
Leu Ser Ala Ala Cys Asp Ala Leu Asp Gln His Asn Leu Lys Gln	765
Asn Asp Gln Pro Met Asp Ile Leu Gln Ile Ile Asn Cys Leu Thr	780
Thr Ile Tyr Asp Arg Leu Glu Gln Glu His Asn Asn Leu Val Asn	795
Val Pro Leu Cys Val Asp Met Cys Leu Asn Trp Leu Leu Asn Val	810

45

Tyr Asp Thr Gly Arg Thr Gly Arg Ile Arg Val Leu Ser Phe Lys 825
 Thr Gly Ile Ile Ser Leu Cys Lys Ala His Leu Glu Asp Lys Tyr 840
 Arg Tyr Leu Phe Lys Gln Val Ala Ser Ser Thr Gly Phe Cys Asp 855
 Gln Arg Arg Leu Gly Leu Leu Leu His Asp Ser Ile Gln Ile Pro 870
 Arg Gln Leu Gly Glu Val Ala Ser Phe Gly Gly Ser Asn Ile Glu 885
 Pro Ser Val Arg Ser Cys Phe Gln Phe Ala Asn Asn Lys Pro Glu 900
 Ile Glu Ala Ala Leu Phe Leu Asp Trp Met Arg Leu Glu Pro Gln 915
 Ser Met Val Trp Leu Pro Val Leu His Arg Val Ala Ala Ala Glu 930

Thr Ala Lys His Gln Ala Lys Cys Asn Ile Cys Lys Glu Cys Pro 945
 Ile Ile Gly Phe Arg Tyr Arg Ser Leu Lys His Phe Asn Tyr Asp 960
 Ile Cys Gln Ser Cys Phe Phe Ser Gly Arg Val Ala Lys Gly His 975
 Lys Met His Tyr Pro Met Val Glu Tyr Cys Thr Pro Thr Thr Ser 990
 Gly Glu Asp Val Arg Asp Phe Ala Lys Val Leu Lys Asn Lys Phe 1005
 Arg Thr Lys Arg Tyr Phe Ala Lys His Pro Arg Met Gly Tyr Leu 1020
 Pro Val Gln Thr Val Leu Glu Gly Asp Asn Met Glu Thr Pro Val 1035
 Thr Leu Ile Asn Phe Trp Pro Val Asp Ser Ala Pro Ala Ser Ser 1050
 Pro Gln Leu Ser His Asp Asp Thr His Ser Arg Ile Glu His Tyr 1065
 Ala Ser Arg Leu Ala Glu Met Glu Asn Ser Asn Gly Ser Tyr Leu 1080
 Asn Asp Ser Ile Ser Pro Asn Glu Ser Ile Asp Asp Glu His Leu 1095
 Leu Ile Gln His Tyr Cys Gln Ser Leu Asn Gln Asp Ser Pro Leu 1110
 Ser Gln Pro Arg Ser Pro Ala Gln Ile Leu Ile Ser Leu Glu Ser 1125
 Glu Glu Arg Gly Glu Leu Glu Arg Ile Leu Ala Asp Leu Glu Glu 1140
 Glu Asn Arg Asn Leu Gln Ala Glu Tyr Asp Arg Leu Lys Gln Gln 1155
 His Glu His Lys Gly Leu Ser Pro Leu Pro Ser Pro Pro Glu Met 1170
 Met Pro Thr Ser Pro Gln Ser Pro Arg Asp Ala Glu Leu Ile Ala 1185
 Glu Ala Lys Leu Leu Arg Gln His Lys Gly Arg Leu Glu Ala Arg 1200
 Met Gln Ile Leu Glu Asp His Asn Lys Gln Leu Glu Ser Gln Leu 1215
 His Arg Leu Arg Gln Leu Leu Glu Gln Pro Gln Ala Glu Ala Lys 1230
 Val Asn Gly Thr Thr Val Ser Ser Pro Ser Thr Ser Leu Gln Arg 1245
 Ser Asp Ser Ser Gln Pro Met Leu Leu Arg Val Val Gly Ser Gln 1260
 Thr Ser Asp Ser Met Gly Glu Glu Asp Leu Leu Ser Pro Pro Gln 1275
 Asp Thr Ser Thr Gly Leu Glu Glu Val Met Glu Gln Leu Asn Asn 1290
 Ser Phe Pro Ser Ser Arg Gly Arg Asn Thr Pro Gly Lys Pro Met 1305
 Arg Glu Asp Thr Met *** 1310

配列番号: 7

配列の長さ: 4075

配列の型: 核酸

鎖の数: 両形態 (both)

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

配列の特徴: active-site

配列

CGGCGCTCT AGAGGATCCC CGGTACCGA GCTCGAATTC CGGAATCCC GGAGAAAAAC 60
 GAATAGGAAA AACTGAAGTG TTACTTTTTT TAAAGCTGCT GAAGTTTGTT GGTTCATCAT 120
 TGTTTTAAAG CCTACTGGAG CAATAAAGTT TGAAGAAGTT TTACCAGGTT TTTTATATCG 180
 CTGCCTTGAT ATACACTTTT CAAAATGCTT TGGTGGGAAG AAGTAGAGGA CTGTTATGAA 240
 AGAGAAGATG TTCAAAAGAA AACATTACCA AAATGGGTAA ATGCACAATT TTCTAAGTTT 300
 GGGAAAGCAGC ATATTGAGAA CCTCTTCAGT GACCTACAGG ATGGGAGGCG CCTCCTAGAC 360
 CTCCTCGAAG GCCTGACAGG GCAAAACTG CCAAAAGAAA AAGGATCCAC AAGAGTTCAT 420

GCCCTGAACA ATGTCAACAA GGCCTGCGG GTTTTGCGA ACAATAATGT TGATTTAGTG 480
 AATATTGGAA GTACTGACAT CGTAGATGGA AATCATAAAC TGACTCTGG TTTGATTTGG 540
 AATATAATCC TCCACTGGCA GGTCAAAAAT GTAATGAAAA ATATCATGGC TGGATTGCAA 600
 CAAACCAACA GTGAAAAGAT TCTCCTGAGC TGGGTCGAC AATCAACTCG TAATTATCCA 660
 CAGGTTAATG TAATCAACTT CACCACCAGC TGGTCTGATG GCCTGGCTTT GAATGCTCTC 720
 ATCCATAGTC ATAGGCCAGA CCTATTTGAC TGGAAATAGT TGGTTTGCCA GCAGTCAGCC 780
 ACACAACGAC TGGAAACATGC ATTCAACATC GCCAGATATC AATTAGGCAT AGAGAAACTA 840
 CTCGATCCTG AAGATGTTGA TACCACCTAT CCAGATAAGA AGTCCATCTT AATGTACATC 900
 ACATCACTCT TCCAAGTTTT GCCTCAACAA GTGAGCATTG AAGCCATCCA GGAAGTGGAA 960
 ATGTTGCCAA GGCCACCTAA AGTGACTAAA GAAGAACATT TTCAGTTACA TCATCAAATG 1020
 CACTATTCTC AACAGATCAC GGTCACTCTA GCACAGGGAT ATGAGAGAAC TTCTTCCCT 1080
 AAGCCTCGAT TCAAGAGCTA TGCTACACA CAGGCTGCTT ATGTACCAC CTCTGACCCT 1140
 ACACGGAGCC CATTTCTTTC ACAGCATTTG GAAGCTCTG AAGACAAGTC ATTTGGCAGT 1200
 TCATTGATGG AGAGTGAAGT AAACCTGGAC CGTTATCAAA CAGCTTTAGA AGAAGTATTA 1260
 TCGTGGCTTC TTTCTGCTGA GGACACATTG CAAGCACAAG GAGAGATTTT TAATGATGTG 1320
 GAAGTGGTGA AAGACCAGTT TCATACTCAT GAGGGGTACA TGATGGATT T GACAGCCCAT 1380
 CAGGGCGGG TTGGTAATAT TCTACAATTG GGAAGTAAGC TGATTGGAAC AGGAAAATTA 1440
 TCAGAAGATG AAGAACTGA AGTACAAGAG CAGATGAATC TCCTAAATTC AAGATGGGAA 1500
 TGCCTCAGG TAGCTAGCAT GGA AAAACAA AGCAATTTAC ATAGAGTTTT AATGGATCTC 1560
 CAGAATCAGA AACTGAAAGA GTTGAATGAC TGGCTAACAA AACAGAAGA AAGAACAAGG 1620

AAAATGGAGG AAGAGCCTCT TGGACCTGAT CTTGAAGACC TAAAACGCCA AGTACAACAA 1680
 CATAAGGTGC TTCAAGAAGA TCTAGAACAA GAACAAGTCA GGGTCAATTC TCTCACTCAC 1740
 ATGGTGGTGG TAGTTGATGA ATCTAGTGGG GATCACGCAA CTGCTGCTTT GGAAGAACAA 1800
 CTTAAGGTAT TGAACACCAG ATGGAAGCTT CTGCAGGTGG CCGTCGAGGA CCGAGTCAGG 1860
 CAGCTGCATG AAGCCACAG GGACTTTGGT CCAGCATCTC AGCACTTTCT TTCCACGTCT 1920
 GTCCAGGGTC CCTGGGAGAG AGCCATCTCG CCAAACAAG TGCCCTACTA TATCAACCAC 1980
 GAGACTCAA CAACTTGCTG GGACCATCCC AAAATGACAG AGCTCTACCA GTCTTTAGCT 2040
 GACCTGAATA ATGTCAGATT CTGAGCTTAT AGGACTGCCA TGAAACTCCG AAGACTGCAG 2100
 AAGGCCCTTT GCTTGGATCT CTTGAGCCTG TCAGCTGCAT GTGATGCCTT GGACCAGCAC 2160
 AACCTCAAGC AAAATGACCA GCCCATGGAT ATCCTGCAGA TTATTAATTG TTTGACCACT 2220
 ATTTATGACC GCCTGGAGCA AGAGCACAAC AATTGGTCA ACGTCCCTCT CTGCGTGGAT 2280
 ATGTGTCTGA ACTGGCTGCT GAATGTTTAT GATACGGGAC GAACAGGGAG GATCGTGTG 2340
 CTGTCTTTTA AAATGGCAT CATTTCCCTG TGTAAAGCAC ATTTGGAAGA CAAGTACAGA 2400
 TACCTTTTCA AGCAAGTGGC AAGTTCAACA GGATTTTGTG ACCAGCGCAG GCTGGGCCTC 2460
 CTTCTGCATG ATTCTATCCA AATTCCAAGA CAGTTGGGTG AAGTTGCATC CTTTGGGGGC 2520
 AGTAACATTG AGCCAAGTGT CCGGAGCTGC TTCCAATTG CTAATAATAA GCCAGAGATC 2580
 GAAGCGGCC TCTTCTAGA CTGGATGAGA CTGGAACCCC AGTCCATGGT GTGGCTGCCC 2640
 GTCTGCACA GAGTGGCTGC TGCAGAACT GCCAAGCATC AGGCCAAATG TAACATCTGC 2700
 AAAGAGTGTG CAATCATTTG ATTCAGGTAC AGGAGTCTAA AGCACTTTAA TTATGACATC 2760
 TGCCAAAGCT GCTTTTTTTC TGGTCGAGTT GCAAAAGGCC ATAAAATGCA CTATCCCATG 2820
 GTGGAATATT GCACTCCGAC TACATCAGGA GAAGATGTTG GAGACTTTGC CAAGTACTA 2880
 AAAAACAAAT TTGGAACAA AAGGTATTTT GCGAAGCATC CCGAATGGG CTACCTGCCA 2940
 GTGCAGACTG TCTTAGAGGG GGACAACATG GAACTCCG TTACTCTGAT CAACTTCTGG 3000
 CCACTAGATT CTGCGCTGC CTGCTCCCT CAGCTTTTAC ACGATGATAC TCATTACCGC 3060
 ATTTGAACATT ATGCTAGCAG GCTAGCAGAA ATGGAAAACA GCAATGGATC TTATCTAAAT 3120
 GATAGCATCT CTCCTAATGA GAGCATAGAT GATGAACATT TGTTAATCCA GCATTACTGC 3180
 CAAAGTTTGA ACCAGGACTC CCCCTGAGC CAGCTCGTA GTCTGCCCA GATCTTGATT 3240
 TCCTTAGAGA GTGAGGAAAG AGGGGAGCTA GAGAGAATCC TAGCAGATCT TGAGGAAGAA 3300
 AACAGGAATC TGCAAGCAGA ATATGACCGT CTAAAGCAGC AGCACGAACA TAAAGCCTG 3360

TCCCCACTGC CGTCCCCTCC TGAAATGATG CCCACCTCTC CCCAGAGTCC CCGGGATGCT 3420
 GAGCTCATTG CTGAGGCCAA GCTACTGCGT CAACACAAAG GCGCCTGGA AGCCAGGATG 3480
 CAAATCCTGG AAGACCACAA TAAACAGCTG GAGTCACAGT TACACAGGCT AAGGCAGCTG 3540
 CTGGAGCAAC CCCAGGCAGA GGCCAAAGTG AATGGCACAA CGGTGTCCTC TCCTTCTACC 3600
 TCTCTACAGA GGTCGACAG CAGTCAGCCT ATGCTGCTCC GAGTGGTTGG CAGTCAAAC 3660
 TCGACTCCA TGGGTGAGGA AGATCTTCTC AGTCCTCCCC AGGACACAAG CACAGGGTTA 3720
 GAGGAGGTGA TGGAGCAACT CAACAACCTC TTCCCTAGTT CAAGAGGAAG AAATACCCCT 3780
 GGAAAGCCAA TGAGAGAGGA CACAATGTAG GAAGTCTTTT CCACATGGCA GATGATTTGG 3840
 GCAGAGCGAT GGAGTCCTTA GTATCAGTCA TGACAGATGA AGAAGGAGCA GAATAAATGT 3900
 TTTACAACCTC CTGATTCCCG CATGGTTTTT ATAATATTCA TACAACAAAG AGGATTAGAC 3960
 AGTAAGAGTT TACAAGAAAT AAATCTATAT TTTGTGAAG GGTAGTGGTA TTATACTGTA 4020
 GATTTAGTA GTTCTAAGT CTGTATTGT TTTGTGGG ATCCTCTAGA GTCGA 4075

配列番号：8

配列の長さ：1201

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列

Met Leu Trp Trp Glu Glu Val Glu Asp Cys Tyr Glu Arg Glu Asp 15
 Val Gln Lys Lys Thr Phe Thr Lys Trp Val Asn Ala Gln Phe Ser 30
 Lys Phe Gly Lys Gln His Ile Glu Asn Leu Phe Ser Asp Leu Gln 45
 Asp Gly Arg Arg Leu Leu Asp Leu Leu Glu Gly Leu Thr Gly Gln 60
 Lys Leu Pro Lys Glu Lys Gly Ser Thr Arg Val His Ala Leu Asn 75
 Asn Val Asn Lys Ala Leu Arg Val Leu Gln Asn Asn Asn Val Asp 90
 Leu Val Asn Ile Gly Ser Thr Asp Ile Val Asp Gly Asn His Lys 105
 Leu Thr Leu Gly Leu Ile Trp Asn Ile Ile Leu His Trp Gln Val 120
 Lys Asn Val Met Lys Asn Ile Met Ala Gly Leu Gln Gln Thr Asn 135
 Ser Glu Lys Ile Leu Leu Ser Trp Val Arg Gln Ser Thr Arg Asn 150
 Tyr Pro Gln Val Asn Val Ile Asn Phe Thr Thr Ser Trp Ser Asp 165
 Gly Leu Ala Leu Asn Ala Leu Ile His Ser His Arg Pro Asp Leu 180
 Phe Asp Trp Asn Ser Val Val Cys Gln Gln Ser Ala Thr Gln Arg 195

Leu Glu His Ala Phe Asn Ile Ala Arg Tyr Gln Leu Gly Ile Glu 210
 Lys Leu Leu Asp Pro Glu Asp Val Asp Thr Thr Tyr Pro Asp Lys 225
 Lys Ser Ile Leu Met Tyr Ile Thr Ser Leu Phe Gln Val Leu Pro 240
 Gln Gln Val Ser Ile Glu Ala Ile Gln Glu Val Glu Met Leu Pro 255
 Arg Pro Pro Lys Val Thr Lys Glu Glu His Phe Gln Leu His His 270
 Gln Met His Tyr Ser Gln Gln Ile Thr Val Ser Leu Ala Gln Gly 285
 Tyr Glu Arg Thr Ser Ser Pro Lys Pro Arg Phe Lys Ser Tyr Ala 300
 Tyr Thr Gln Ala Ala Tyr Val Thr Thr Ser Asp Pro Thr Arg Ser 315
 Pro Phe Pro Ser Gln His Leu Glu Ala Pro Glu Asp Lys Ser Phe 330
 Gly Ser Ser Leu Met Glu Ser Glu Val Asn Leu Asp Arg Tyr Gln 345
 Thr Ala Leu Glu Glu Val Leu Ser Trp Leu Leu Ser Ala Glu Asp 360
 Thr Leu Gln Ala Gln Gly Glu Ile Ser Asn Asp Val Glu Val Val 375
 Lys Asp Gln Phe His Thr His Glu Gly Tyr Met Met Asp Leu Thr 390
 Ala His Gln Gly Arg Val Gly Asn Ile Leu Gln Leu Gly Ser Lys 405
 Leu Ile Gly Thr Gly Lys Leu Ser Glu Asp Glu Glu Thr Glu Val 420
 Gln Glu Gln Met Asn Leu Leu Asn Ser Arg Trp Glu Cys Leu Arg 435
 Val Ala Ser Met Glu Lys Gln Ser Asn Leu His Arg Val Leu Met 450

51

Asp Leu Gln Asn Gln Lys Leu Lys Glu Leu Asn Asp Trp Leu Thr	465
Lys Thr Glu Glu Arg Thr Arg Lys Met Glu Glu Glu Pro Leu Gly	480
Pro Asp Leu Glu Asp Leu Lys Arg Gln Val Gln Gln His Lys Val	495
Leu Gln Glu Asp Leu Glu Gln Glu Gln Val Arg Val Asn Ser Leu	510
Thr His Met Val Val Val Val Asp Glu Ser Ser Gly Asp His Ala	525
Thr Ala Ala Leu Glu Glu Gln Leu Lys Val Leu Asn Thr Arg Trp	540
Lys Leu Leu Gln Val Ala Val Glu Asp Arg Val Arg Gln Leu His	555
Glu Ala His Arg Asp Phe Gly Pro Ala Ser Gln His Phe Leu Ser	570
Thr Ser Val Gln Gly Pro Trp Glu Arg Ala Ile Ser Pro Asn Lys	585
Val Pro Tyr Tyr Ile Asn His Glu Thr Gln Thr Thr Cys Trp Asp	600
His Pro Lys Met Thr Glu Leu Tyr Gln Ser Leu Ala Asp Leu Asn	615
Asn Val Arg Phe Ser Ala Tyr Arg Thr Ala Met Lys Leu Arg Arg	630
Leu Gln Lys Ala Leu Cys Leu Asp Leu Leu Ser Leu Ser Ala Ala	645
Cys Asp Ala Leu Asp Gln His Asn Leu Lys Gln Asn Asp Gln Pro	660
Met Asp Ile Leu Gln Ile Ile Asn Cys Leu Thr Thr Ile Tyr Asp	675
Arg Leu Glu Gln Glu His Asn Asn Leu Val Asn Val Pro Leu Cys	690
Val Asp Met Cys Leu Asn Trp Leu Leu Asn Val Tyr Asp Thr Gly	705
Arg Thr Gly Arg Ile Arg Val Leu Ser Phe Lys Thr Gly Ile Ile	720
Ser Leu Cys Lys Ala His Leu Glu Asp Lys Tyr Arg Tyr Leu Phe	735
Lys Gln Val Ala Ser Ser Thr Gly Phe Cys Asp Gln Arg Arg Leu	750
Gly Leu Leu Leu His Asp Ser Ile Gln Ile Pro Arg Gln Leu Gly	765
Glu Val Ala Ser Phe Gly Gly Ser Asn Ile Glu Pro Ser Val Arg	780
Ser Cys Phe Gln Phe Ala Asn Asn Lys Pro Glu Ile Glu Ala Ala	795
Leu Phe Leu Asp Trp Met Arg Leu Glu Pro Gln Ser Met Val Trp	810
Leu Pro Val Leu His Arg Val Ala Ala Ala Glu Thr Ala Lys His	825
Gln Ala Lys Cys Asn Ile Cys Lys Glu Cys Pro Ile Ile Gly Phe	840
Arg Tyr Arg Ser Leu Lys His Phe Asn Tyr Asp Ile Cys Gln Ser	855
Cys Phe Phe Ser Gly Arg Val Ala Lys Gly His Lys Met His Tyr	870
Pro Met Val Glu Tyr Cys Thr Pro Thr Thr Ser Gly Glu Asp Val	885
Arg Asp Phe Ala Lys Val Leu Lys Asn Lys Phe Arg Thr Lys Arg	900
Tyr Phe Ala Lys His Pro Arg Met Gly Tyr Leu Pro Val Gln Thr	915
Val Leu Glu Gly Asp Asn Met Glu Thr Pro Val Thr Leu Ile Asn	930
Phe Trp Pro Val Asp Ser Ala Pro Ala Ser Ser Pro Gln Leu Ser	945
His Asp Asp Thr His Ser Arg Ile Glu His Tyr Ala Ser Arg Leu	960
Ala Glu Met Glu Asn Ser Asn Gly Ser Tyr Leu Asn Asp Ser Ile	975
Ser Pro Asn Glu Ser Ile Asp Asp Glu His Leu Leu Ile Gln His	990
Tyr Cys Gln Ser Leu Asn Gln Asp Ser Pro Leu Ser Gln Pro Arg	1005
Ser Pro Ala Gln Ile Leu Ile Ser Leu Glu Ser Glu Glu Arg Gly	1020
Glu Leu Glu Arg Ile Leu Ala Asp Leu Glu Glu Glu Asn Arg Asn	1035
Leu Gln Ala Glu Tyr Asp Arg Leu Lys Gln Gln His Glu His Lys	1050
Gly Leu Ser Pro Leu Pro Ser Pro Pro Glu Met Met Pro Thr Ser	1065
Pro Gln Ser Pro Arg Asp Ala Glu Leu Ile Ala Glu Ala Lys Leu	1080
Leu Arg Gln His Lys Gly Arg Leu Glu Ala Arg Met Gln Ile Leu	1095
Glu Asp His Asn Lys Gln Leu Glu Ser Gln Leu His Arg Leu Arg	1110
Gln Leu Leu Glu Gln Pro Gln Ala Glu Ala Lys Val Asn Gly Thr	1125
Thr Val Ser Ser Pro Ser Thr Ser Leu Gln Arg Ser Asp Ser Ser	1140
Gln Pro Met Leu Leu Arg Val Val Gly Ser Gln Thr Ser Asp Ser	1155
Met Gly Glu Glu Asp Leu Leu Ser Pro Pro Gln Asp Thr Ser Thr	1170

53

Gly Leu Glu Glu Val Met Glu Gln Leu Asn Asn Ser Phe Pro Ser 1185
 Ser Arg Gly Arg Asn Thr Pro Gly Lys Pro Met Arg Glu Asp Thr 1200
 Met *** 1201

配列番号: 9

配列の長さ: 3172

配列の型: 核酸

鎖の数: 両形態 (both)

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

配列の特徴: active-site

配列

CGGCGCTCT AGAGGATCCC CGGTACCGA GCTCGAATTC CGGAATCCC GGAGAAAAAC 60
 GAATAGGAAA AACTGAAGTG TTACTTTTTT TAAAGCTGCT GAAGTTTGT TTTTTCAT 120
 TGTTTTAAG CCTACTGGAG CAATAAGTT TGAAGAACTT TTACCAGTT TTTTTATCG 180
 CTGCCTTAT ATACACTTTT CAAAATGCTT TGGTGGGAAG AAGTAGAGGA CTGTTATGAA 240
 AGAGAAGATG TTCAAAAGAA AACATTCACA AAATGGGTAA ATGCACAATT TTCTAAGTTT 300
 GGGGAAGCAGC ATATTGAGAA CCTCTTCAGT GACCTACAGG ATGGGAGGCG CCTCCTAGAC 360
 CTCCTCGAAG GCCTGACAGG GCAAAACTG CCAAAAGAAA AAGGATCCAC AAGAGTTCAT 420
 GCCCTGAACA ATGTCAACAA GGCCTGCGG GTTTTGCGA ACAATAATGT TGATTTAGTG 480
 AATATTGGAA GTACTGACAT CGTAGATGGA AATCATAAAC TGACTCTGG TTTGATTGG 540
 AATATAATCC TCCACTGGCA GGTCAAAAAT GTAATGAAAA ATATCATGGC TGGATTGCAA 600
 CAAACCAACA GTGAAAAGAT TCTCTGAGC TGGGTCCGAC AATCAACTCG TAATTATCCA 660
 CAGGTTAATG TAATCAACTT CACCACCAGC TGGTCTGATG GCCTGGCTTT GAATGCTCTC 720
 ATCCATAGTC ATAGGCCAGA CCTATTGAC TGAATAGTG TGGTTTGCCA GCAGTCAGCC 780
 ACACAACGAC TGGAAACATG ATTCAACATC GCCAGATATC AATTAGGCAT AGAGAACTA 840

 CTCGATCCTG AAGATGTTGA TACCACCTAT CCAGATAAGA AGTCCATCTT AATGTACATC 900
 ACATCACTCT TCCAAGTTT GCCTCAACAA GTGAGCATTG AAGCCATCCA GGAAGTGGAA 960
 ATGTTGCCAA GGCCACCTAA AGTGAATAAA GAAGAACATT TTCAGTTACA TCATCAAATG 1020
 CACTATTCTC AACAGATCAC GGTCACTCTA GCACAGGGAT ATGAGAGAAC TTCTCCCTCT 1080
 AAGCCTGAT TCAAGAGCTA TGCTACACA CAGGCTGCTT ATGTCACCAC CTCTGACCCT 1140
 ACACGGAGCC CATTTCTTTC ACAGCATTG GAAGCTCTG AAGACCGAAG ACTGCAGAAG 1200
 GCCCTTGTCT TGGATCTCTT GAGCCTGTCA GCTGCATGTG ATGCCTTGA CCAGCACAAC 1260
 CTCAGCAAAA ATGACCAGCC CATGGATATC CTGCAGATTA TTAATTGTTT GACCACTATT 1320
 TATGACGCC TGGAGCAAGA GCACAACAAT TTGGTCAACG TCCCTCTCTG CGTGGATATG 1380
 TGTCTGAAT GGTCTGTGAA TGTTTATGAT ACGGGACGAA CAGGGAGGAT CGGTGTCCTG 1440
 TCTTTAAAA CTGGCATCAT TTCCCTGTGT AAAGCACATT TGGAGACAA GTACAGATAC 1500
 CTTTTCAAGC AAGTGGCAAG TTCAACAGGA TTTTGTGACC AGCGCAGGCT GGGCCTCCTT 1560
 CTGCATGATT CTATCCAAAT TCCAAGACAG TTGGGTGAAG TTGCATCCTT TGGGGCAGT 1620
 AACATTGAGC CAAGTGTCCG GAGCTGCTTC CAATTGCTA ATAATAAGCC AGAGATCGAA 1680
 GCGGCCCTCT TCCTAGACTG GATGAGACTG GAACCCAGT CCATGGTGTG GCTGCCCGTC 1740
 CTGCACAGAG TGGCTGCTGC AGAACTGCC AAGCATCAGG CCAATGTAA CATCTGCAAA 1800
 GAGTGTCCAA TCATTGGATT CAGGTACAGG AGTCTAAGC ACTTTAATTA TGACATCTGC 1860
 CAAAGCTGCT TTTTTCTGG TCGAGTTGCA AAAGGCCATA AAATGCACTA TCCCATGGTG 1920
 GAATATTGCA CTCGACTAC ATCAGAGAAA GATGTTGAG ACTTTGCCAA GGTACTAAAA 1980
 AACAAATTC GAACAAAAG GTATTTTGGC AAGCATCCCC GAATGGGCTA CCGCCAGTG 2040
 CAGACTGTCT TAGAGGGGGA CAACATGGAA ACTCCCGTTA CTCTGATCAA CTTCTGGCCA 2100
 GTAGATTCTG CGCTGCCTC GTCCCTCAG CTTTCACAG ATGATACTCA TTCAAGCATT 2160
 GAACATTATG CTAGCAGGCT AGCAGAAATG GAAAACAGCA ATGGATCTTA TCTAAATGAT 2220
 AGCATCTCTC CTAATGAGAG CATAGATGAT GAACATTTGT TAATCCAGCA TTAATGCCAA 2280

55

AGTTTGAACC AGGACTCCCC CTTGAGCCAG CCTCGTAGTC CTGCCAGAT CTTGATTTCC 2340
 TTAGAGAGTG AGGAAAGAGG GGAGCTAGAG AGAATCCTAG CAGATCTGA GGAAGAAAAC 2400
 AGGAATCTGC AAGCAGAATA TGACCGTCTA AAGCAGCAGC ACGAACATAA AGGCCTGTCC 2460
 CCACTGCCGT CCCCTCTGA AATGATGCCC ACCTCTCCCC AGAGTCCCCG GGATGCTGAG 2520
 CTCATTGCTG AGGCCAAGCT ACTGCGTCAA CACAAAGGCC GCCTGGAAGC CAGGATGCAA 2580

ATCCTGGAAG ACCACAATAA ACAGCTGGAG TCACAGTTAC ACAGGCTAAG GCAGCTGCTG 2640
 GAGCAACCCC AGGCAGAGGC CAAAGTGAAT GGCACAACGG TGTCTCTCC TTCTACCTCT 2700
 CTACAGAGGT CCGACAGCAG TCAGCCTATG CTGCTCGAG TGGTTGGCAG TCAAACCTCG 2760
 GACTCCATGG GTGAGGAAGA TCTTCTCAGT CCTCCCCAGG ACACAAGCAC AGGGTTAGAG 2820
 GAGGTGATGG AGCAACTCAA CAACTCCTTC CTTAGTTCAA GAGGAAGAAA TACCCCTGGA 2980
 AAGCCAATGA GAGAGGACAC AATGTAGGAA GTCTTTTCCA CATGGCAGAT GATTGGGCA 2940
 GAGCGATGGA GTCCTTAGTA TCAGTCATGA CAGATGAAGA AGGAGCAGAA TAAATGTTTT 3000
 ACAACTCCTG ATTCCTCATG GGTTTTATA ATATTCATAC AACAAAGAGG ATTAGACAGT 3060
 AAGAGTTTAC AAGAAATAA TCTATATTTT TGTGAAGGT AGTGGTATTA TACTGTAGAT 3120
 TTCAGTAGTT TCTAAGTCTG TTATTGTTTT GTTGGGGATC CTCTAGAGTC GA 3172

配列番号: 10

配列の長さ: 900

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: タンパク質

配列

Met Leu Trp Trp Glu Glu Val Glu Asp Cys Tyr Glu Arg Glu Asp 15
 Val Gln Lys Lys Thr Phe Thr Lys Trp Val Asn Ala Gln Phe Ser 30
 Lys Phe Gly Lys Gln His Ile Glu Asn Leu Phe Ser Asp Leu Gln 45
 Asp Gly Arg Arg Leu Leu Asp Leu Leu Glu Gly Leu Thr Gly Gln 60
 Lys Leu Pro Lys Glu Lys Gly Ser Thr Arg Val His Ala Leu Asn 75
 Asn Val Asn Lys Ala Leu Arg Val Leu Gln Asn Asn Asn Val Asp 90
 Leu Val Asn Ile Gly Ser Thr Asp Ile Val Asp Gly Asn His Lys 105
 Leu Thr Leu Gly Leu Ile Trp Asn Ile Ile Leu His Trp Gln Val 120
 Lys Asn Val Met Lys Asn Ile Met Ala Gly Leu Gln Gln Thr Asn 135
 Ser Glu Lys Ile Leu Leu Ser Trp Val Arg Gln Ser Thr Arg Asn 150
 Tyr Pro Gln Val Asn Val Ile Asn Phe Thr Thr Ser Trp Ser Asp 165
 Gly Leu Ala Leu Asn Ala Leu Ile His Ser His Arg Pro Asp Leu 180
 Phe Asp Trp Asn Ser Val Val Cys Gln Gln Ser Ala Thr Gln Arg 195
 Leu Glu His Ala Phe Asn Ile Ala Arg Tyr Gln Leu Gly Ile Glu 210
 Lys Leu Leu Asp Pro Glu Asp Val Asp Thr Thr Tyr Pro Asp Lys 225

Lys Ser Ile Leu Met Tyr Ile Thr Ser Leu Phe Gln Val Leu Pro 240
 Gln Gln Val Ser Ile Glu Ala Ile Gln Glu Val Glu Met Leu Pro 255
 Arg Pro Pro Lys Val Thr Lys Glu Glu His Phe Gln Leu His His 270
 Gln Met His Tyr Ser Gln Gln Ile Thr Val Ser Leu Ala Gln Gly 285
 Tyr Glu Arg Thr Ser Ser Pro Lys Pro Arg Phe Lys Ser Tyr Ala 300
 Tyr Thr Gln Ala Ala Tyr Val Thr Thr Ser Asp Pro Thr Arg Ser 315
 Pro Phe Pro Ser Gln His Leu Glu Ala Pro Glu Asp Arg Arg Leu 330
 Gln Lys Ala Leu Cys Leu Asp Leu Leu Ser Leu Ser Ala Ala Cys 345
 Asp Ala Leu Asp Gln His Asn Leu Lys Gln Asn Asp Gln Pro Met 360
 Asp Ile Leu Gln Ile Ile Asn Cys Leu Thr Thr Ile Tyr Asp Arg 375
 Leu Glu Gln Glu His Asn Asn Leu Val Asn Val Pro Leu Cys Val 390
 Asp Met Cys Leu Asn Trp Leu Leu Asn Val Tyr Asp Thr Gly Arg 405

57

Thr Gly Arg Ile Arg Val Leu Ser Phe Lys Thr Gly Ile Ile Ser	420
Leu Cys Lys Ala His Leu Glu Asp Lys Tyr Arg Tyr Leu Phe Lys	435
Gln Val Ala Ser Ser Thr Gly Phe Cys Asp Gln Arg Arg Leu Gly	450
Leu Leu Leu His Asp Ser Ile Gln Ile Pro Arg Gln Leu Gly Glu	465
Val Ala Ser Phe Gly Gly Ser Asn Ile Glu Pro Ser Val Arg Ser	480
Cys Phe Gln Phe Ala Asn Asn Lys Pro Glu Ile Glu Ala Ala Leu	495
Phe Leu Asp Trp Met Arg Leu Glu Pro Gln Ser Met Val Trp Leu	510
Pro Val Leu His Arg Val Ala Ala Ala Glu Thr Ala Lys His Gln	525
Ala Lys Cys Asn Ile Cys Lys Glu Cys Pro Ile Ile Gly Phe Arg	540
Tyr Arg Ser Leu Lys His Phe Asn Tyr Asp Ile Cys Gln Ser Cys	555
Phe Phe Ser Gly Arg Val Ala Lys Gly His Lys Met His Tyr Pro	570
Met Val Glu Tyr Cys Thr Pro Thr Thr Ser Gly Glu Asp Val Arg	585
Asp Phe Ala Lys Val Leu Lys Asn Lys Phe Arg Thr Lys Arg Tyr	600
Phe Ala Lys His Pro Arg Met Gly Tyr Leu Pro Val Gln Thr Val	615
Leu Glu Gly Asp Asn Met Glu Thr Pro Val Thr Leu Ile Asn Phe	630
Trp Pro Val Asp Ser Ala Pro Ala Ser Ser Pro Gln Leu Ser His	645
Asp Asp Thr His Ser Arg Ile Glu His Tyr Ala Ser Arg Leu Ala	660

Glu Met Glu Asn Ser Asn Gly Ser Tyr Leu Asn Asp Ser Ile Ser	675
Pro Asn Glu Ser Ile Asp Asp Glu His Leu Leu Ile Gln His Tyr	690
Cys Gln Ser Leu Asn Gln Asp Ser Pro Leu Ser Gln Pro Arg Ser	705
Pro Ala Gln Ile Leu Ile Ser Leu Glu Ser Glu Glu Arg Gly Glu	720
Leu Glu Arg Ile Leu Ala Asp Leu Glu Glu Glu Asn Arg Asn Leu	735
Gln Ala Glu Tyr Asp Arg Leu Lys Gln Gln His Glu His Lys Gly	750
Leu Ser Pro Leu Pro Ser Pro Pro Glu Met Met Pro Thr Ser Pro	765
Gln Ser Pro Arg Asp Ala Glu Leu Ile Ala Glu Ala Lys Leu Leu	780
Arg Gln His Lys Gly Arg Leu Glu Ala Arg Met Gln Ile Leu Glu	795
Asp His Asn Lys Gln Leu Glu Ser Gln Leu His Arg Leu Arg Gln	810
Leu Leu Glu Gln Pro Gln Ala Glu Ala Lys Val Asn Gly Thr Thr	825
Val Ser Ser Pro Ser Thr Ser Leu Gln Arg Ser Asp Ser Ser Gln	840
Pro Met Leu Leu Arg Val Val Gly Ser Gln Thr Ser Asp Ser Met	855
Gly Glu Glu Asp Leu Leu Ser Pro Pro Gln Asp Thr Ser Thr Gly	870
Leu Glu Glu Val Met Glu Gln Leu Asn Asn Ser Phe Pro Ser Ser	885
Arg Gly Arg Asn Thr Pro Gly Lys Pro Met Arg Glu Asp Thr Met	900

配列番号: 11

配列の長さ: 3163

配列の型: 核酸

鎖の数: 両形態 (both)

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

配列の特徴: active-site

配列

CGGCCGCTCT AGAGGATCCC CGGGTACCGA GCTCGAATTC CGGAACCCC GGAGAAAAAC	60
GAATAGGAAA AACTGAAGTG TTACTTTTTT TAAAGCTGCT GAAGTTTGTT GGTTCAT	120
TGTTTTAAG CCTACTGGAG CAATAAAGTT TGAAGAATT TTACCAGTT TTTTATCG	180
CTGCCTGAT ATACACTTTT CAAAATGCTT TGGTGGGAAG AAGTAGAGGA CTGTTATGAA	240
AGAGAAGATG TTCAAAGAA AACATTCACA AAATGGGTAA ATGCACAATT TTCTAAGTTT	300
GGGAAGCAGC ATATTGAGAA CCTCTTCAGT GACCTACAGG ATGGGAGGCG CCTCCTAGAC	360
CTCCTCGAAG GCCTGACAGG GCAAAAAGT CCAAAGAAA AAGGATCCAC AAGAGTTCAT	420

GCCCTGAACA	ATGTCAACAA	GGCACTGCGG	GTTTTCGAGA	ACAATAATGT	TGATTTAGTG	480
AATATTGGAA	GTAATGACAT	CGTAGATGGA	AATCATAAAC	TGACTCTTGG	TTTGATTGG	540
AATATAATCC	TCCACTGGCA	GGTCAAAAAT	GTAATGAAAA	ATATCATGGC	TGGATTGCAA	600
CAAACCAACA	GTGAAAAGAT	TCTCCTGAGC	TGGGTCCGAC	AATCAACTCG	TAATTATCCA	660
CAGGTTAATG	TAATCAACTT	CACCACCAGC	TGGTCTGATG	GCCTGGCTTT	GAATGCTCTC	720
ATCCATAGTC	ATAGGCCAGA	CCTATTTGAC	TGGAATAGTG	TGGTTTGCCA	GCAGTCAGCC	780
ACACAACGAC	TGGAACATGC	ATTCAACATC	GCCAGATATC	AATTAGGCAT	AGAGAACTA	840
CTCGATCCTG	AAGATGTTGA	TACCACCTAT	CCAGATAAGA	AGTCCATCTT	AATGTACATC	900
ACATCACTCT	TCCAAGTTTT	GCCTCAACAA	GTGAGCATTG	AAGCCATCCA	GGAAGTGGA	960
GCCACACAGG	ACTTTGGTCC	AGCATCTCAG	CACTTTCTTT	CCACGTCTGT	CCAGGGTCCC	1020
TGGGAGAGAG	CCATCTCGCC	AAACAAAGTG	CCCTACTATA	TCAACCAAGA	GACTCAAACA	1080
ACTTGCTGGG	ACCATCCCAA	AATGACAGAG	CTCTACCAGT	CTTTAGCTGA	CCTGAATAAT	1140
GTCAGATTCT	CAGCTTATAG	GACTGCCATG	AAACTCCGAA	GACTGCAGAA	GGCCCTTTGC	1200
TTGGATCTCT	TGAGCCTGTC	AGCTGCATGT	GATGCCTTGG	ACCAGCACAA	CCTCAAGCAA	1260
AATGACCAGC	CCATGGATAT	CCTGCAGATT	ATTAATTGTT	TGACCACTAT	TTATGACCGC	1320
CTGGAGCAAG	AGCACAACAA	TTTGGTCAAC	GTCCCTCTCT	GCGTGGATAT	GTGTCTGAAC	1380
TGGCTGTGTA	ATGTTTATGA	TACGGGACGA	ACAGGGAGGA	TCCGTGTCTT	GTCTTTTAAA	1440
ACTGGCATCA	TTTCCCTGTG	TAAAGCACAT	TTGGAAGACA	AGTACAGATA	CCTTTTCAAG	1500
CAAGTGGCAA	GTTCAACAGG	ATTTTGTGAC	CAGCGCAGGC	TGGGCCTCCT	TCTGCATGAT	1560
TCTATCCAAA	TTCCAAGACA	GTTGGGTGAA	GTTGCATCCT	TTGGGGGCAG	TAACATTGAG	1620
CCAAGTGTCC	GGAGCTGCTT	CCAATTGCT	AATAATAAGC	CAGAGATCGA	AGCGGCCCTC	1680
TTCTAGACT	GGATGAGACT	GGAAACCCAG	TCCATGGTGT	GGCTGCCCGT	CCTGCACAGA	1740
GTGGCTGCTG	CAGAACTGC	CAAGCATCAG	GCCAAATGTA	ACATCTGCAA	AGAGTGTCCA	1800
ATCATTGGAT	TCAGGTACAG	GAGTCTAAAG	CACTTTAATT	ATGACATCTG	CCAAAGCTGC	1860
TTTTTTTCTG	GTCGAGTTGC	AAAAGGCCAT	AAAATGCACT	ATCCCATGGT	GGAATATTGC	1920
ACTCGACTA	CATCAGGAGA	AGATGTTGGA	GACTTTGCCA	AGGTAATAAA	AAACAAATTT	1980
CGAACCAAAA	GGTATTTTGC	GAAGCATCCC	CGAATGGGCT	ACCTGCCAGT	GCAGACTGTC	2040
TTAGAGGGGG	ACAACATGGA	AACTCCCGTT	ACTCTGATCA	ACTTCTGGCC	AGTAGATTCT	2100
GCGCCTGCCT	CGTCCCTCA	GCTTTCACAC	GATGATACTC	ATTCACGCAT	TGAACATTAT	2160
GCTAGCAGGC	TAGCAGAAAT	GGAAACAGC	AATGGATCTT	ATCTAAATGA	TAGCATCTCT	2220
CCTAATGAGA	GCATAGATGA	TGAACATTTG	TTAATCCAGC	ATTACTGCCA	AAGTTTGAAC	2280
CAGGACTCCC	CCCTGAGCCA	GCCTGTAAGT	CCTGCCCAGA	TCTTGATTTC	CTTAGAGAGT	2340
GAGGAAAGAG	GGGAGCTAGA	GAGAATCCTA	GCAGATCTTG	AGGAAGAAAA	CAGGAATCTG	2400
CAAGCAGAAT	ATGACCGTCT	AAAGCAGCAG	CACGAACATA	AAGGCCTGTC	CCCACTGCCG	2460
TCCCTCCTG	AAATGATGCC	CACCTCTCCC	CAGAGTCCCC	GGGATGCTGA	GCTCATTGCT	2520
GAGGCCAAGC	TACTGCGTCA	ACACAAAGGC	CGCCTGGAAG	CCAGGATGCA	AATCCTGGAA	2580
GACCACAATA	AACAGCTGGA	GTACAGTTA	CACAGGCTAA	GGCAGCTGCT	GGAGCAACCC	2640
CAGGCAGAGG	CCAAAGTGAA	TGGCACAACG	GTGTCCTCTC	CTTCTACCTC	TCTACAGAGG	2700
TCCGACAGCA	GTGAGCTAT	GCTGCTCGA	GTGGTTGGCA	GTCAAATTC	GGACTCCATG	2760
GGTGAGGAAG	ATCTTCTCAG	TCCTCCCCAG	GACACAAGCA	CAGGGTTAGA	GGAGGTGATG	2820
GAGCAACTCA	ACAATCCTT	CCCTAGTTCA	AGAGGAAGAA	ATACCCCTGG	AAAGCCAATG	2880
AGAGAGGACA	CAATGTAGGA	AGTCTTTTCC	ACATGGCAGA	TGATTTGGGC	AGAGCGATGG	2940
AGTCCTTAGT	ATCAGTCATG	ACAGATGAAG	AAGGAGCAGA	ATAAATGTTT	TACAACTCCT	3000
GATTCCCGCA	TGTTTTTTAT	AATATTCATA	CAACAAAGAG	GATTAGACAG	TAAGAGTTTA	3060
CAAGAAATAA	ATCTATATTT	TTGTGAAGGG	TAGTGGTATT	ATACTGTAGA	TTTCAGTAGT	3120
TTCTAAGTCT	GTTATTGTTT	TGTTGGGGAT	CCTCTAGAGT	CGA		3163

配列番号: 12

配列の長さ: 897

61

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: タンパク質

配列

Met Leu Trp Trp Glu Glu Val Glu Asp Cys Tyr Glu Arg Glu Asp	15
Val Gln Lys Lys Thr Phe Thr Lys Trp Val Asn Ala Gln Phe Ser	30
Lys Phe Gly Lys Gln His Ile Glu Asn Leu Phe Ser Asp Leu Gln	45
Asp Gly Arg Arg Leu Leu Asp Leu Leu Glu Gly Leu Thr Gly Gln	60
Lys Leu Pro Lys Glu Lys Gly Ser Thr Arg Val His Ala Leu Asn	75
Asn Val Asn Lys Ala Leu Arg Val Leu Gln Asn Asn Asn Val Asp	90
Leu Val Asn Ile Gly Ser Thr Asp Ile Val Asp Gly Asn His Lys	105
Leu Thr Leu Gly Leu Ile Trp Asn Ile Ile Leu His Trp Gln Val	120
Lys Asn Val Met Lys Asn Ile Met Ala Gly Leu Gln Gln Thr Asn	135
Ser Glu Lys Ile Leu Leu Ser Trp Val Arg Gln Ser Thr Arg Asn	150
Tyr Pro Gln Val Asn Val Ile Asn Phe Thr Thr Ser Trp Ser Asp	165
Gly Leu Ala Leu Asn Ala Leu Ile His Ser His Arg Pro Asp Leu	180
Phe Asp Trp Asn Ser Val Val Cys Gln Gln Ser Ala Thr Gln Arg	195
Leu Glu His Ala Phe Asn Ile Ala Arg Tyr Gln Leu Gly Ile Glu	210
Lys Leu Leu Asp Pro Glu Asp Val Asp Thr Thr Tyr Pro Asp Lys	225
Lys Ser Ile Leu Met Tyr Ile Thr Ser Leu Phe Gln Val Leu Pro	240
Gln Gln Val Ser Ile Glu Ala Ile Gln Glu Val Glu Ala His Arg	255
Asp Phe Gly Pro Ala Ser Gln His Phe Leu Ser Thr Ser Val Gln	270
Gly Pro Trp Glu Arg Ala Ile Ser Pro Asn Lys Val Pro Tyr Tyr	285
Ile Asn His Glu Thr Gln Thr Thr Cys Trp Asp His Pro Lys Met	300
Thr Glu Leu Tyr Gln Ser Leu Ala Asp Leu Asn Asn Val Arg Phe	315
Ser Ala Tyr Arg Thr Ala Met Lys Leu Arg Arg Leu Gln Lys Ala	330
Leu Cys Leu Asp Leu Leu Ser Leu Ser Ala Ala Cys Asp Ala Leu	345
Asp Gln His Asn Leu Lys Gln Asn Asp Gln Pro Met Asp Ile Leu	360
Gln Ile Ile Asn Cys Leu Thr Thr Ile Tyr Asp Arg Leu Glu Gln	375
Glu His Asn Asn Leu Val Asn Val Pro Leu Cys Val Asp Met Cys	390
Leu Asn Trp Leu Leu Asn Val Tyr Asp Thr Gly Arg Thr Gly Arg	405
Ile Arg Val Leu Ser Phe Lys Thr Gly Ile Ile Ser Leu Cys Lys	420
Ala His Leu Glu Asp Lys Tyr Arg Tyr Leu Phe Lys Gln Val Ala	435
Ser Ser Thr Gly Phe Cys Asp Gln Arg Arg Leu Gly Leu Leu Leu	450
His Asp Ser Ile Gln Ile Pro Arg Gln Leu Gly Glu Val Ala Ser	465
Phe Gly Gly Ser Asn Ile Glu Pro Ser Val Arg Ser Cys Phe Gln	480
Phe Ala Asn Asn Lys Pro Glu Ile Glu Ala Ala Leu Phe Leu Asp	495
Trp Met Arg Leu Glu Pro Gln Ser Met Val Trp Leu Pro Val Leu	510
His Arg Val Ala Ala Ala Glu Thr Ala Lys His Gln Ala Lys Cys	525
Asn Ile Cys Lys Glu Cys Pro Ile Ile Gly Phe Arg Tyr Arg Ser	540
Leu Lys His Phe Asn Tyr Asp Ile Cys Gln Ser Cys Phe Phe Ser	555
Gly Arg Val Ala Lys Gly His Lys Met His Tyr Pro Met Val Glu	570
Tyr Cys Thr Pro Thr Thr Ser Gly Glu Asp Val Arg Asp Phe Ala	585
Lys Val Leu Lys Asn Lys Phe Arg Thr Lys Arg Tyr Phe Ala Lys	600
His Pro Arg Met Gly Tyr Leu Pro Val Gln Thr Val Leu Glu Gly	615
Asp Asn Met Glu Thr Pro Val Thr Leu Ile Asn Phe Trp Pro Val	630
Asp Ser Ala Pro Ala Ser Ser Pro Gln Leu Ser His Asp Asp Thr	645
His Ser Arg Ile Glu His Tyr Ala Ser Arg Leu Ala Glu Met Glu	660

63

64

Asn Ser Asn Gly Ser Tyr Leu Asn Asp Ser Ile Ser Pro Asn Glu	675
Ser Ile Asp Asp Glu His Leu Leu Ile Gln His Tyr Cys Gln Ser	690
Leu Asn Gln Asp Ser Pro Leu Ser Gln Pro Arg Ser Pro Ala Gln	705
Ile Leu Ile Ser Leu Glu Ser Glu Glu Arg Gly Glu Leu Glu Arg	720
Ile Leu Ala Asp Leu Glu Glu Glu Asn Arg Asn Leu Gln Ala Glu	735
Tyr Asp Arg Leu Lys Gln Gln His Glu His Lys Gly Leu Ser Pro	750
Leu Pro Ser Pro Pro Glu Met Met Pro Thr Ser Pro Gln Ser Pro	765
Arg Asp Ala Glu Leu Ile Ala Glu Ala Lys Leu Leu Arg Gln His	780
Lys Gly Arg Leu Glu Ala Arg Met Gln Ile Leu Glu Asp His Asn	795
Lys Gln Leu Glu Ser Gln Leu His Arg Leu Arg Gln Leu Leu Glu	810
Gln Pro Gln Ala Glu Ala Lys Val Asn Gly Thr Thr Val Ser Ser	825
Pro Ser Thr Ser Leu Gln Arg Ser Asp Ser Ser Gln Pro Met Leu	840
Leu Arg Val Val Gly Ser Gln Thr Ser Asp Ser Met Gly Glu Glu	855
Asp Leu Leu Ser Pro Pro Gln Asp Thr Ser Thr Gly Leu Glu Glu	870
Val Met Glu Gln Leu Asn Asn Ser Phe Pro Ser Ser Arg Gly Arg	885
Asn Thr Pro Gly Lys Pro Met Arg Glu Asp Thr Met ***	897

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、様々な数のロッド・リピートを持つ短縮型ジストロフィン遺伝子の構築をしめたものである。図1のAは、ヒト全長型ジストロフィン遺伝子、ミニジストロフィン遺伝子及び新しく作製した短縮型ジストロフィンcDNAの一覧を示したものである。図1のBは、 Δ DysAX2 (AX2), Δ DysAX (AX11), Δ DysAH3 (AH3) 及び Δ DysM3 (M3) における再構築したロッド・リピートのアミノ酸配列を示したものである。図1のCは、 Δ DysH1 (H1) 及び Δ DysH4 (H4) における連結領域の*

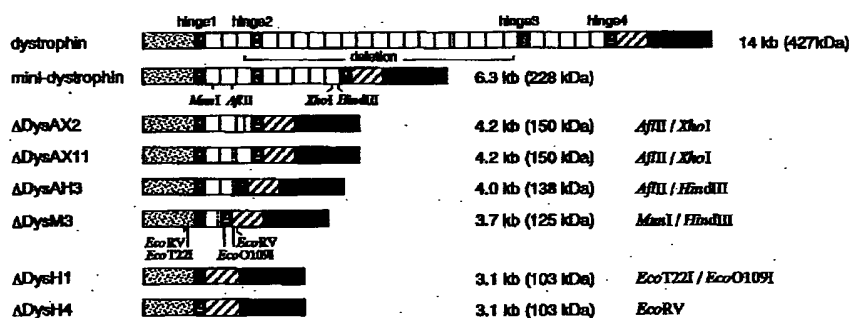
*アミノ酸配列を示すものである。

【図2】図2は、アデノウイルスベクターを用いた短縮型ジストロフィンcDNAのマウス骨格筋細胞株への導入の結果を示すものである。

【図3】図3は、アデノウイルスベクターを用いた短縮型ジストロフィンcDNAのmdxマウスの骨格筋への導入を示す図面に代わる写真である。

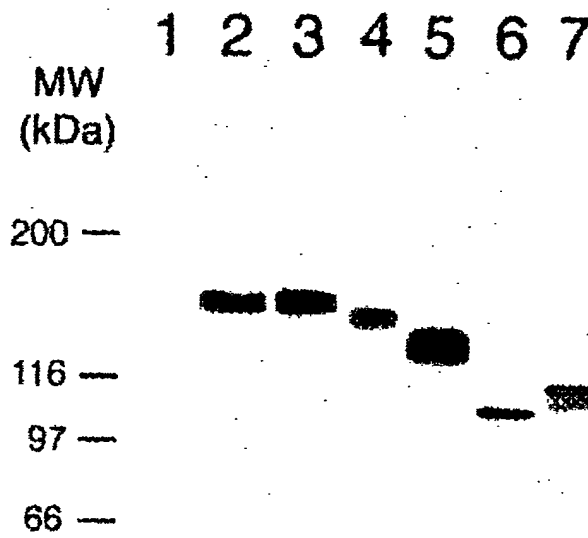
【図4】図4は、AxCA Δ DysM3を注射したmdx骨格筋の形質膜におけるジストロフィン結合蛋白質の回復を示す図面に代わる写真である。

【図1】



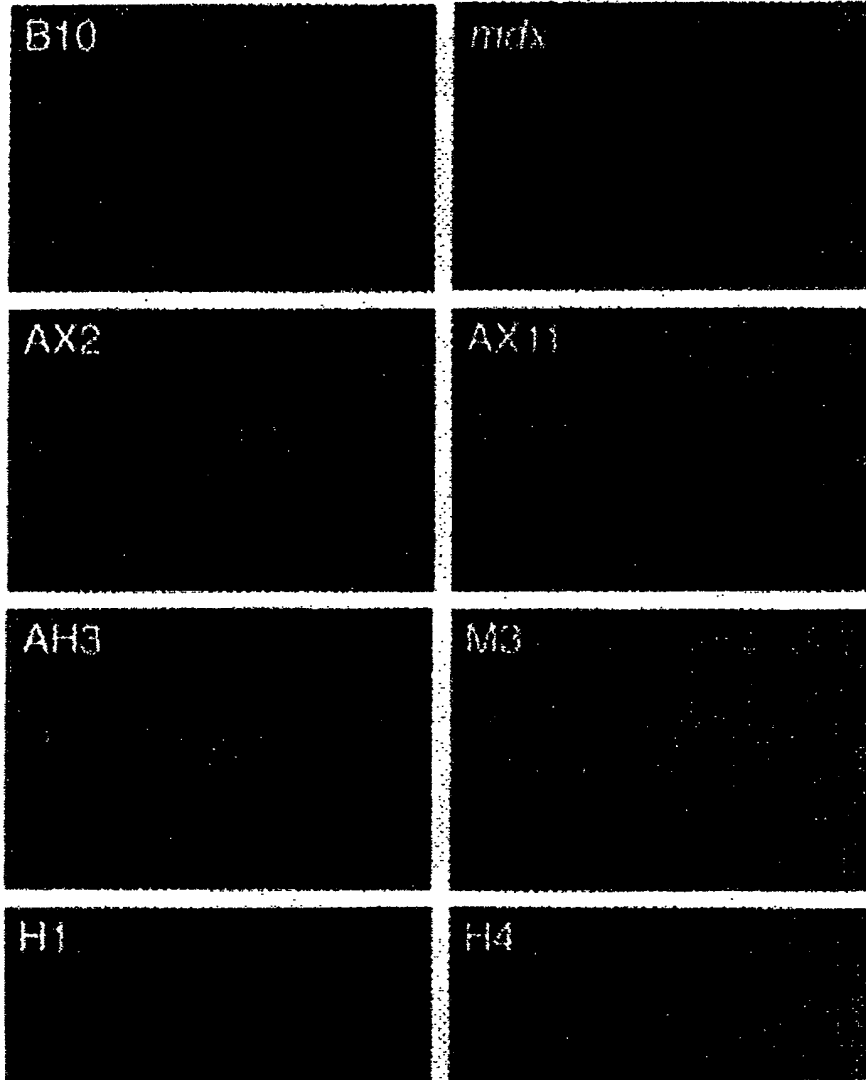
【図2】

図面代用写真



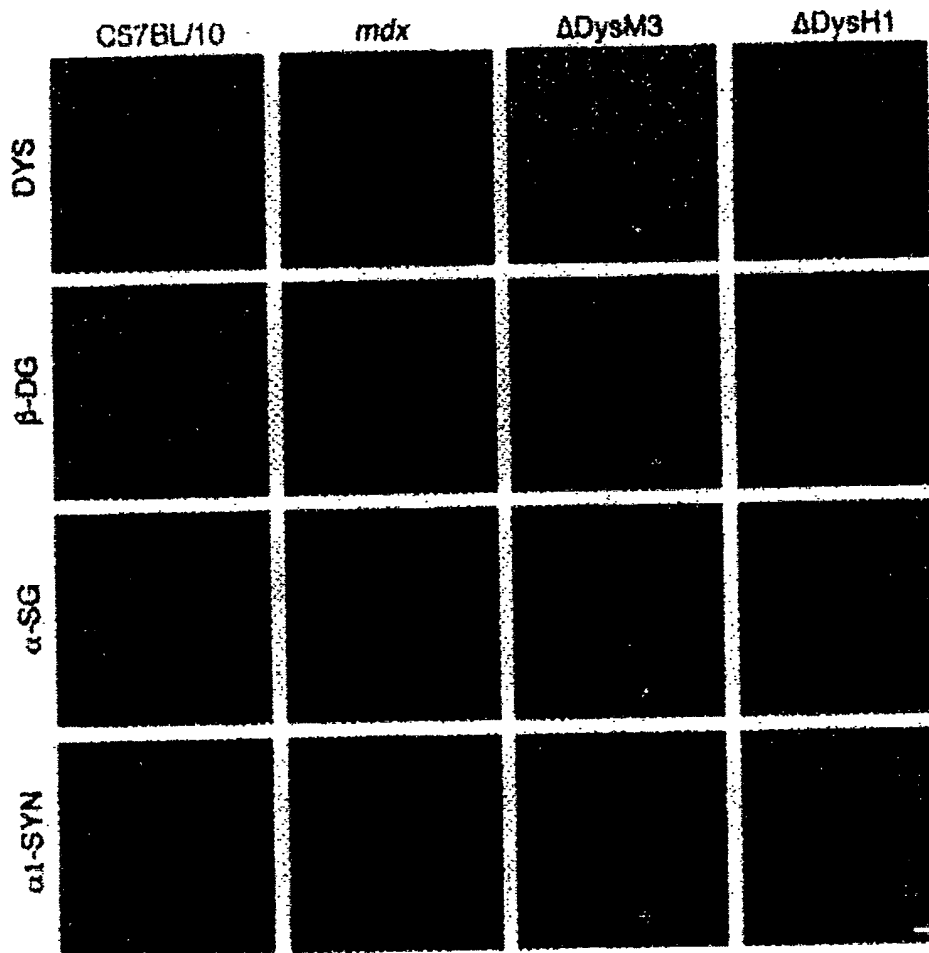
【図3】

図面代用写真

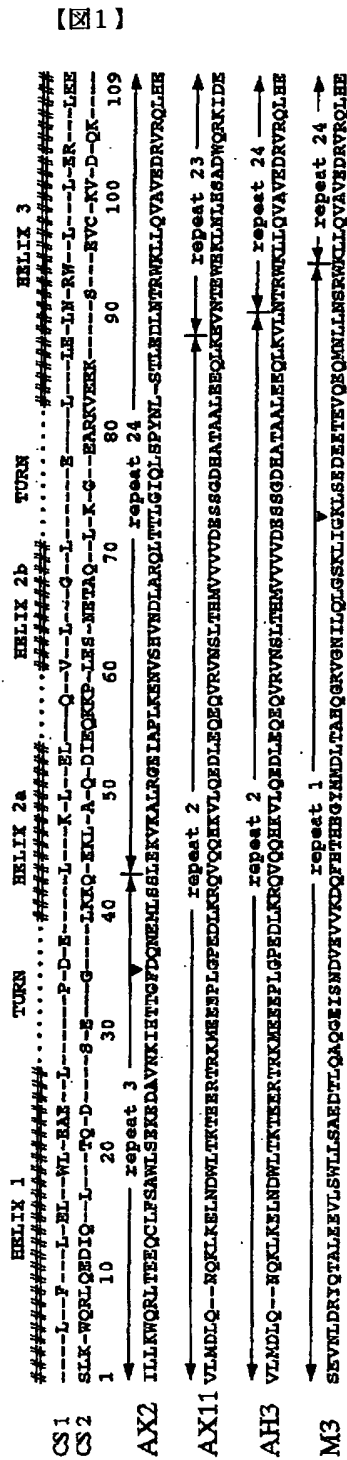


【図4】

図面代用写真

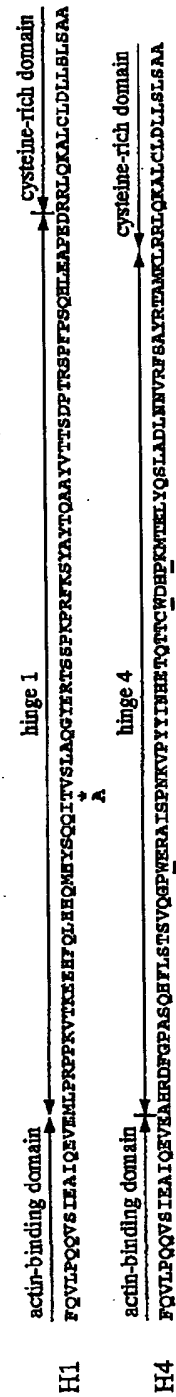


B



C

[図1]



【手続補正書】

【提出日】平成10年7月21日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0019

【補正方法】変更

【補正内容】

【0019】全長型ジストロフィン遺伝子は、N末端よりアクチン結合ドメイン、ロッド・ドメイン、システイン・リッチ・ドメイン、そして、C末端ドメインをコードしている。本発明者らは、8個のロッド・リピートを持つヒトミニ・ジストロフィン遺伝子(6.3kb)を材料にして、ロッド・ドメインを更に短縮した6種類のロッド短縮型ジストロフィンcDNAを構築した(図1)。全ての構築物は、N末のアクチン結合ドメイン、システイン・リッチ・ドメイン、そして、C末端ドメインを残している。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0020

【補正方法】変更

【補正内容】

【0020】デザインされた Δ DysAX2, AX11, AH3及びM3は、それぞれ、3個、3個、2個、1個のロッド・リピートとヒンジ1とヒンジ4の両方を持っている。これらの4つの短縮型ジストロフィンにおいて、融合部分でロッドリピートの推定トリプル・ヘリカル構造(ケーニッヒら、ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー、265巻、4560-4566頁(1990年)[Koenig, M. and Kunkel, L. M. (1990) J. Biol. Chem. 265, 4560-4566.])を維持するようにcDNAをデザインした(図5)。一方、 Δ DysH1及びH4は、ロッド・リピートは全く持たず、それぞれ、ヒンジ1か4のどちらかを持っている(図1、図6)。これらのcDNAの構築のために使用したプライマーやオリゴヌクレオチドの塩基配列は、後述する実施例1の表1に示されている。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0023

【補正方法】変更

【補正内容】

【0023】得られたプラスミドpBSBMDとプライマーF1/R1(表1参照)またはF2/R2(表1参照)で増幅したPCR断片を、AflIII/XhoIで切断した後、pBSBMDのAflIII/XhoI部位に挿入し、それぞれ、pBS Δ DysAX2またはpBS Δ DysAX11を作製した。次に、鋳型のpBSBMDとプライマーF4/R4(表1参照)で増幅したP

CR産物をMunI/Hind IIIで切断した後、pBSBMDのMunI/Hind III部位に挿入し、pBS Δ DysM3を作製した。続いて、オリゴヌクレオチドF3/R3(表1参照)のアニーンリングにより作製した断片を、pBSBMDのAflIII/Hind III部位の連結に使用し、pBS Δ DysAH3を作製した。これらの挿入断片は、連結した際、ロッド・リピートのトリプル・ヘリカル構造を維持するようにデザインした。連結したロッド・リピートのアミノ酸配列を図5に示す。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0024

【補正方法】変更

【補正内容】

【0024】この結果、 Δ DysAX2, AX11, AH3及びM3は、N末端のアクチン結合ドメイン、システイン・リッチ・ドメインとC末端ドメインを保持し、更にそれぞれ3個、3個、2個、1個のロッド・リピートとヒンジ1と4の両方を持つ。 Δ DysH1と Δ DysH4のcDNAをもつ2個のプラスミドは、pBS Δ DysM3(図1)から作製した。1個のEcoO109I部位を除くために、pBS Δ DysM3をApaIで切断し、平滑化後、セルフライゲーションさせ、pBS Δ DysM3bを作製した。鋳型のpBS Δ DysM3とプライマーF5/R5(表1参照)を使って増幅したPCR産物をEcoT22I/EcoO109Iで切断した後、これをpBS Δ DysM3bのEcoT22I/EcoO109I部位に挿入し、pBS Δ DysH1を作製した。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0025

【補正方法】変更

【補正内容】

【0025】pBS Δ DysH4の作製のために、pBS Δ DysM3を鋳型とし、プライマーF5/R6(表1参照)あるいはF6/R7(表1参照)を使って2種類のPCR反応を別個に行った。得られた2種類のPCR産物の混合物を鋳型として、プライマーF5/R7(表1参照)を使って2回目のPCR反応を行った。得られた断片をEcoRVで切断した後、これをpBS Δ DysM3中の2個のEcoRV部位の間に挿入した。連結領域のアミノ酸配列を図6に示す。得られた Δ DysH1及びH4は、ロッド・リピートは全く持たず、それぞれ、ヒンジ1か4のどちらかを持つ(図1)。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0026

【補正方法】変更

【補正内容】

【0026】図1、図5及び図6は、様々な数のロッド・リピートを持つ短縮型ジストロフィン遺伝子の構築を示したものである。図1は、ヒト全長型ジストロフィン遺伝子、ミニジストロフィン遺伝子及び新しく作製した短縮型ジストロフィンcDNAの一覧図である。ΔDysAX2, ΔDysAX, ΔDysAH3及びΔDysM3を構築するために、ミニジストロフィンcDNAの中央部のロッド・ドメインをそれぞれの構築物の右側に示した制限酵素で切断した。ロッド・リピート構造を再構築するために、PCR増幅断片あるいは合成DNA断片を使って得られた両末端を連結させた。ΔDysH1及びΔDysH4を構築するために、ΔDysM3を図示した制限酵素で切断後、PCR増幅断片を使って両末端を連結した。点線は連結部を示す。cDNAのサイズと短縮型ジストロフィンの推定分子量を右側に示す。アクチン結合ドメインを点々のボックスで、ロッド・ドメインを白抜きボックスで（それぞれのリピートを1個のボックスで示す）、システイン・リッチ・ドメインを斜線の入ったボックスで、そして、C末端ドメインは陰を付けたボックスで図示する。黒色のボックスはヒンジを示す。ヒンジの記載はM. KoenigとL. M. Kunkelの記述に従った。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0027

【補正方法】変更

【補正内容】

【0027】図5は、ΔDysAX2 (AX2), ΔDysAX11 (AX11), ΔDysAH3 (AH3) 及びΔDysM3 (M3) における再構築したロッド・リピートのアミノ酸配列を示す。縦線は連結部位を示す。三角形と点線は、ロッド・リピートの整列を最適化するためのギャップと欠失の位置を示す (M. KoenigとL. M. Kunkelによる)。CS1とCS2はジストロフィンの24個のリピートのコンセンサス配列を示す。CS1は、24個のリピートのうち少なくとも8個のリピートの中に見つかったアミノ酸を、CS2は5、6あるいは7個のリピートに見られるアミノ酸を示す。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0028

【補正方法】変更

【補正内容】

【0028】図6は、ΔDysH1 (H1) 及びΔDysH4 (H4) における連結領域のアミノ酸配列ΔDysH1 (H1) では、ヒンジ1はシステイン・リッチ・ドメインに直結する。ΔDysH4 (H4) では、アク

チン結合ドメインはヒンジ4に直結する。ヒンジ1にあるチロシン (T) (星印) は、北アメリカのXLCMの家系でアラニン (A) に変異していた。ヒンジ4の下で点線はWWドメインを示す；WWドメインのうち、最も保存されたアミノ酸を下線で示す。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0062

【補正方法】変更

【補正内容】

【0062】実施例1 (ロッド短縮型ジストロフィン遺伝子の構築)

以下に示す方法を用いて、ロッド・ドメインをさらに短縮したジストロフィン遺伝子を6種類構築した (図1参照)。最初に、ヒトミニ・ジストロフィンcDNA (アスカディら、ネイチャー、352巻、615-818頁 (1991年) [Acsadi, G., Dickson, G., Love, D. R., Jani, A., Walsh, F. S., Gurusinge, A., Wolff, T. A., and Davies, K. E. (1991) *Nature* 352, 815-818.]) である6.3kbのNotI/SalI断片をpBluescriptII (SK+) (Stratagene) のNotI/SalI部位に挿入してpBSBMDを作製した。次に、AX2, AX11, AH3, M3と名付けた短縮型ジストロフィン (ΔDys) のcDNAを持つ4つのプラスミドを以下に示すように作製した。cDNAの構築のために使用されたプライマーやオリゴヌクレオチドの塩基配列を、表1に示す。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0065

【補正方法】変更

【補正内容】

【0065】一方、ΔDysH1とΔDysH4のcDNAをもつ2つのプラスミドは、pBSΔDysM3 (図1参照) から作製した。まず、EcoO109I部位を一つ除くために、pBSΔDysM3をApaIで切断、平滑化後、セルフライゲーションさせpBSΔDysM3bとした。鋳型のpBSΔDysM3と、プライマーF5/R5を使って増幅したPCR産物を、EcoT22I/EcoO109Iで切断した後、pBSΔDysM3bのEcoT22I/EcoO109I部位に挿入し、pBSΔDysH1を作製した。pBSΔDysH4の作製のためには、2種類のPCR反応を、pBSΔDysM3を鋳型として、プライマーF5/R6あるいはF6/R7を使って別個に行った。得られた2種類のPCR産物の混合物を鋳型として、プライマーF5/R7を使って2回目のPCR反応を行った。得られた断片をEcoRVで切断した後、これをpBSΔDy

sM3中の2個のEcoRV部位の間に挿入した。連結領域のアミノ酸配列を図5と図6に示す。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】変更

【補正内容】

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、様々な数のロッド・リピートを持つ短縮型ジストロフィン遺伝子の構築をしめたものである。図1は、ヒト全長型ジストロフィン遺伝子、ミニジストロフィン遺伝子及び新しく作製した短縮型ジストロフィンcDNAの一覧を示したものである。

【図2】図2は、アデノウイルスベクターを用いた短縮型ジストロフィンcDNAのマウス骨格筋細胞株への導入の結果を示すものである。

【図3】図3は、アデノウイルスベクターを用いた短縮型ジストロフィンcDNAのmdxマウスの骨格筋への導入を示す図面に代わる写真である。

【図4】図4は、AxCAΔDysM3を注射したmdx骨格筋の形質膜におけるジストロフィン結合蛋白質の回復を示す図面に代わる写真である。

【図5】図5は、様々な数のロッド・リピートを持つ短縮型ジストロフィン遺伝子の構築のうちの、ΔDysAX2 (AX2)、ΔDysAX (AX11)、ΔDysAH3 (AH3) 及びΔDysM3 (M3) における再構築したロッド・リピートのアミノ酸配列を示したものである。

【図6】図6は、様々な数のロッド・リピートを持つ短縮型ジストロフィン遺伝子の構築のうちの、ΔDysH1 (H1) 及びΔDysH4 (H4) における連結領域のアミノ酸配列を示すものである。

【手続補正12】

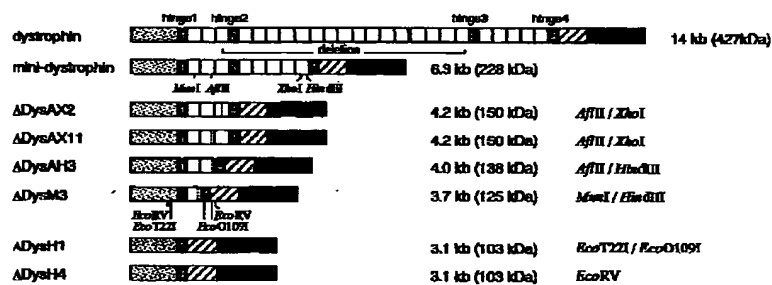
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】全図

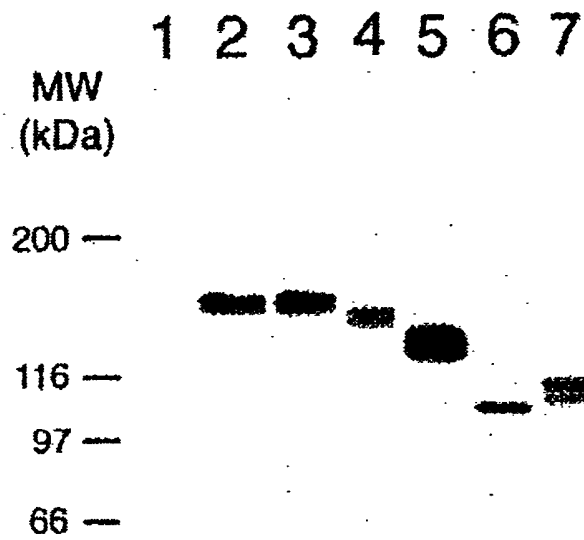
【補正方法】変更

【補正内容】

【図1】

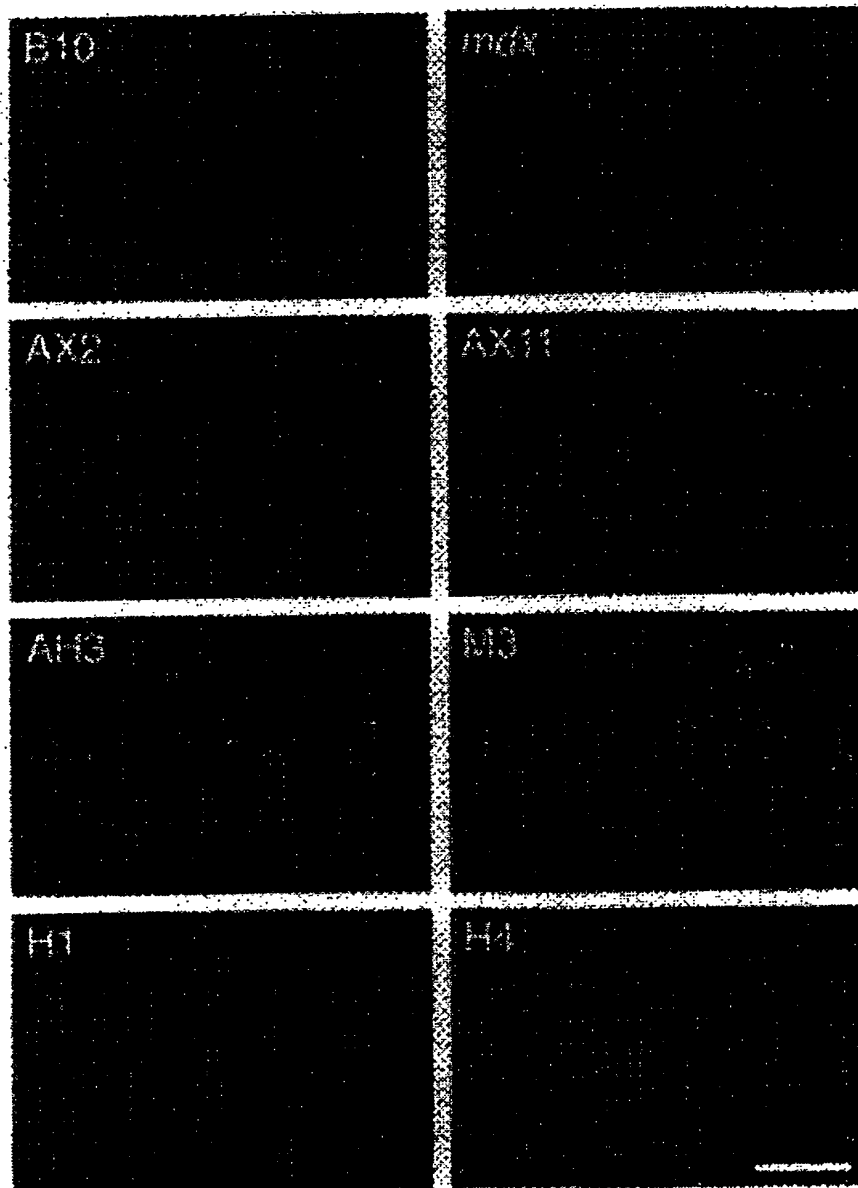


【図2】



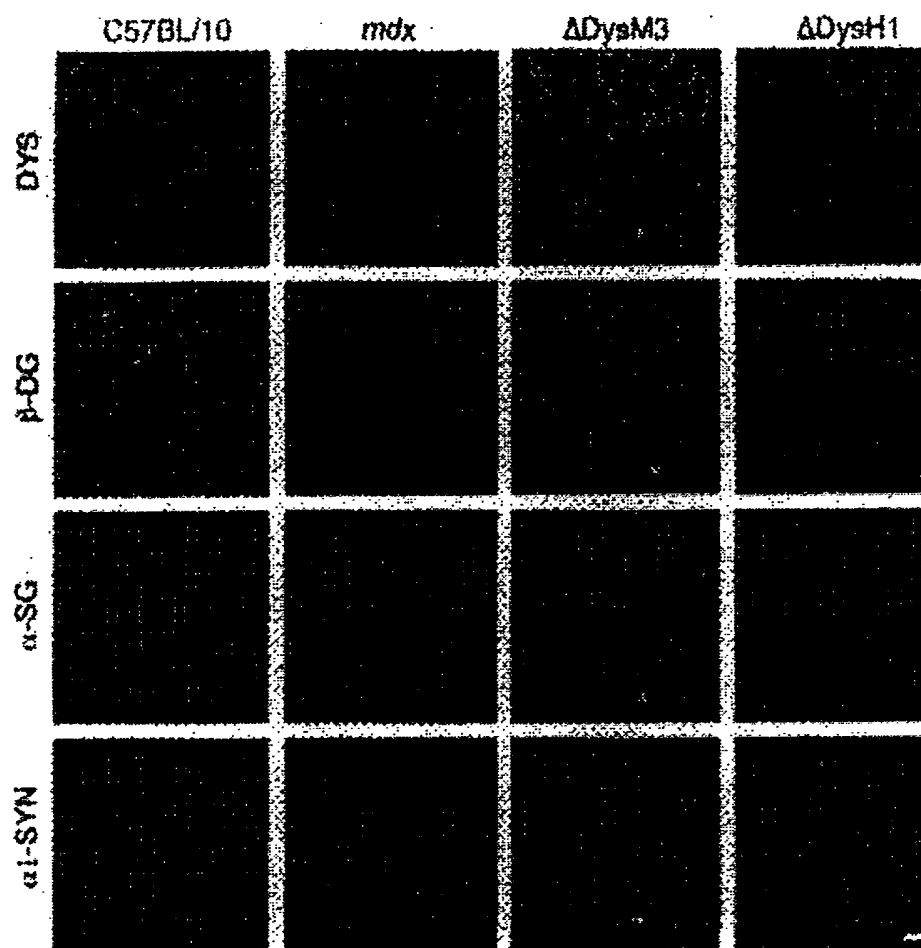
図面代用写真

【図3】



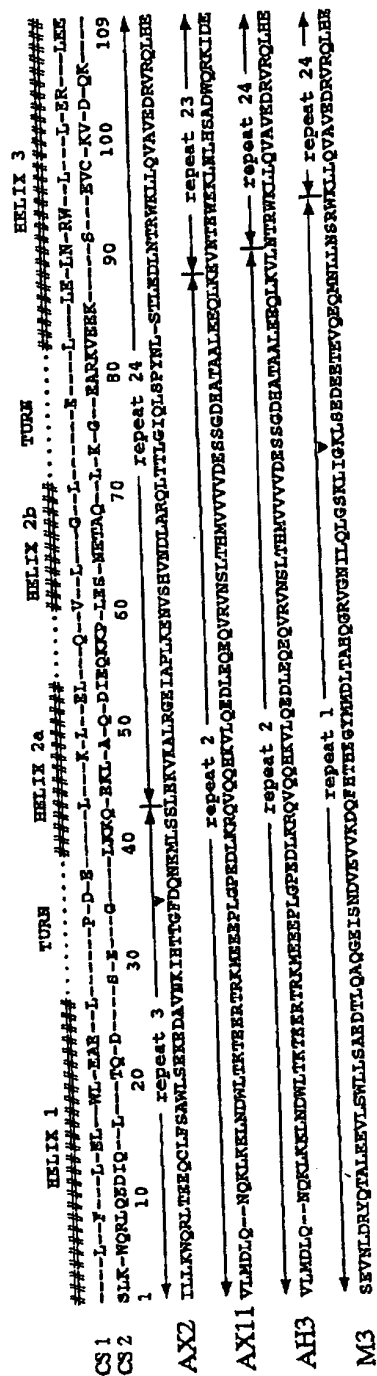
図面代用写真

【図4】



図面代用写真

【図5】



【図6】

